

REAKTION VON MENSCHLICHER
GRANULOZYTEN-ELASTASE
MIT ISOLIERTEM MENSCHLICHEM
ANTITHROMBIN III, α_2 -ANTIPLASMIN
UND α_1 -ANTICHYMOTRYPSIN

Stefan Lander

Diss
München
1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0053

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München
Leitung: Prof. Dr. H. Fritz

REAKTION VON MENSCHLICHER GRANULOZYTEN-ELASTASE MIT
ISOLIERTEM MENSCHLICHEM ANTITHROMBIN III, α_2 -ANTIPLASMIN
UND α_1 -ANTICHYMOTRYPSIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stefan Lander

München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.1986

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H. Fritz danke ich für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung bei der Arbeit.

Frau Dr. M. Jochum möchte ich sehr herzlich danken für Ihre große Hilfsbereitschaft und stets vorhandene Aufmerksamkeit.

Mein besonderer Dank gilt auch den medizinisch-technischen Assistentinnen U. Hof und C. Seidl, die mir sowohl bei der praktischen Arbeit sehr behilflich waren als auch durch die nette Atmosphäre im Labor über manche Tiefpunkte hinweggeholfen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIALIEN UND GERÄTE	6
2.1 Materialien	6
2.2 Geräte	6
3. METHODEN	7
3.1 Isolierung der Granulozyten-Elastase	7
3.2 Isolierung des Bowman-Birk-Inhibitors	7
3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	8
3.4 Immunelektrophorese	10
3.5 Enzymtests	11
3.6 Proteinbestimmung	13
4. VERSUCHE UND ERGEBNISSE	14
4.1 Hemmung der PMN-Elastase	14
4.1.1 PMN-Elastase + Bowman-Birk-Inhibitor	14
4.1.2 PMN-Elastase + Eglin b	15
4.2 Reaktion von Antithrombin III mit PMN-Elastase	16
4.2.1 Enzymatische Tests	17
4.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	21
4.2.3 Rocket-Immunelektrophorese	24
4.2.4 Zweidimensionale Immunelektrophorese	25

	Seite
4.3 Reaktion von α_2 -Antiplasmin mit PMN-Elastase	28
4.3.1 Enzymatische Tests	29
4.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	32
4.3.3 Rocket-Immunelektrophoresen	35
4.3.4 Zweidimensionale Immunelektrophorese	36
4.4 Reaktion von α_1 -Antichymotrypsin mit PMN-Elastase	40
4.4.1 Enzymatische Tests	41
4.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	43
4.4.3 Rocket-Immunelektrophoresen	50
4.4.4 Zweidimensionale Immunelektrophorese	51
5. DISKUSSION	56
5.1 Umsetzung von AT III mit PMN-Elastase	56
5.2 Umsetzung von α_2 -PI mit PMN-Elastase	60
5.3 Umsetzung von α_1 -Achy mit PMN-Elastase	63
6. LITERATURVERZEICHNIS	65
LEBENS LAUF	72

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α_1 -Achy	α_1 -Antichymotrypsin
α_1 -PI	α_1 -Proteinaseinhibitor (= α_1 -Antitrypsin)
α_2 -PI	α_2 -Antiplasmin
AT III	Antithrombin III
L-BAPA	L-N-Benzoyl-Arginin-p-Nitroanilid
BBi	Bowman-Birk-Inhibitor
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
IU	Inhibitoreinheit
PER	Ammoniumperoxodisulfat
PMN	polymorphnuclear (polymorphkernig)
SANA	3-Carboxypropionyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Alanyl-p-Nitroanilid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-äthylendiamin
TRA	Triäthanolamin
TRIS	Tris-hydroxyaminomethan

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Interaktion von Granulocyten-Elastase (PMN-Elastase), isoliert aus Granulocyten vom Mensch, mit gereinigtem Antithrombin III, α_2 -Antiplasmin und α_1 -Antichymotrypsin vom Mensch untersucht. Keiner dieser Plasmaproteinase-Inhibitoren zeigte eine Hemmwirkung gegenüber PMN-Elastase.

1) PMN-Elastase bewirkt in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration eine zunehmende Inaktivierung von Antithrombin III: Bei einem Molverhältnis Elastase zu Antithrombin III von 0,4 : 1 wurde die Hemmwirkung des Antithrombin III gegenüber Thrombin nach nur 5-minütiger Inkubation bei 25°C nahezu vollständig aufgehoben. Die Untersuchungen mit Polyacrylamidgelelektrophorese und Rocket-Immunelektrophorese zeigten jedoch nur einen geringfügigen Abbau des Antithrombin III durch PMN-Elastase. In der zweidimensionalen Immunelektrophorese mit Heparin in der 1. Dimension weist das mit PMN-Elastase umgesetzte Antithrombin III eine signifikant langsamere Mobilität als Antithrombin III auf. Es kann demnach angenommen werden, daß bei der Umsetzung mit PMN-Elastase die Heparin-Bindungsstellen des Antithrombin III durch Peptidspaltung modifiziert oder von PMN-Elastase besetzt werden. Die Proteinase-Inhibitoren Eglin b und Bowman-Birk-Inhibitor verhinderten sehr wirksam die Inaktivierung des Antithrombin III durch PMN-Elastase. Dies gibt Anlaß zur Vermutung, daß ein Teil des Antithrombin III-Verbrauchs bei Septikämikern durch einen Abbau des Antithrombin III durch PMN-Elastase bewirkt wird. Ein daraus resultierender Antithrombin III-Mangel könnte dann durch den Einsatz spezifischer gereinigter Inhibitoren bereits im frühen Stadium einer Septikämie verhindert werden.

2) α_2 -Antiplasmin wurde bei einem Molverhältnis von 0,1 Mol Elastase zu 1 Mol α_2 -Antiplasmin nahezu vollständig inaktiviert: nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C hatte α_2 -Antiplasmin seine Hemmaktivität gegenüber Plasmin zu ca. 90% verloren. In der Polyacrylamid-gelelektrophorese zeigte sich mit steigenden Mengen PMN-Elastase ein zunehmender Abbau des α_2 -Antiplasmin, wobei wohl Peptide mit höherer Mobilität entstehen. Untersuchungen mit Rocket-Immunelektrophorese und 2-dimensionaler Immunelektrophorese ergaben keine Änderung der Antigen-Eigenschaften des α_2 -Antiplasmin. Vermutlich bleiben die Antigen-Determinanten des α_2 -Antiplasmin bei der Reaktion mit PMN-Elastase unverändert.

In der akuten Phase nach Polytrauma kommt es zu einer gesteigerten Fibrinolyse mit Anstieg der Fibrinogen-Spaltprodukte. Diese Hyperfibrinolyse könnte möglicherweise auf eine erhöhte Plasminaktivität aufgrund der Inaktivierung des α_2 -Antiplasmin durch PMN-Elastase zurückgeführt werden. Der Einsatz geeigneter Inhibitoren der PMN-Elastase sollte diese Hyperfibrinolyse demnach verhindern.

3) Die Umsetzung von α_1 -Antichymotrypsin mit PMN-Elastase führt mit steigenden Enzymmengen zu einem zunehmenden Aktivitätsverlust des α_1 -Antichymotrypsin: Bei einem Verhältnis von 0,2 Mol PMN-Elastase zu 1 Mol α_1 -Antichymotrypsin (30 Minuten Inkubation, 37°C) war fast keine Hemmaktivität des α_1 -Antichymotrypsin gegenüber α -Chymotrypsin mehr nachweisbar. Die Polyacrylamidgelelektrophorese lieferte Hinweise, daß bei dieser Umsetzung wohl in erster Linie eine Änderung in der Molekularstruktur des α_1 -Antichymotrypsin resultiert, die das reaktive Zentrum des α_1 -Antichymotrypsin für α -Chymotrypsin unzugänglich macht. Mit der Rocket- und 2-dimensionalen Immunelektrophorese ließ sich keine Modifizierung des α_1 -Antichymotrypsin zeigen.

1. EINLEITUNG

Die polymorphkernigen Granulozyten von Mensch und Säugetieren enthalten in ihren Lysosomen neben zahlreichen anderen Enzymen eine neutrale Proteinase, die in der Lage ist, Elastin zu lysieren: die sog. Granulozyten- oder PMN-Elastase (5, 34, 55). Physiologischerweise trägt die PMN-Elastase aus den azurophilen Granula wesentlich zum Abbau von phagozytiertem Material innerhalb der Zelle bei. Pathophysiologischerweise wird sie neben anderen granulozytären Inhaltsstoffen bei Stimulierung der neutrophilen Granulozyten z.B. durch Komplement-Komponenten, Antigen-Antikörper-Komplexe oder Endotoxin extrazellulär, d.h. überwiegend in die Zirkulation ausgeschüttet (19, 32, 71). Dort wird sie jedoch relativ rasch zu ca. 90% von α_1 -Proteinaseinhibitor (früher: α_1 -Antitrypsin), dem wichtigsten Elastase-Inhibitor des Blutplasmas, und zu ca. 10% von α_2 -Makroglobulin gebunden (19, 29, 51 - 53) (siehe Abbildung 1). Im Blut gesunder Personen zirkulieren bis zu ca. 135 ng PMN-Elastase pro Milliliter gebunden an α_1 -Proteinaseinhibitor (57).

Die PMN-Elastase besitzt proteolytische Aktivität nicht nur gegenüber ihrem natürlichen Substrat, dem Elastin, sondern auch gegen Casein und Fibrin (5, 19). Bemerkenswert ist die offensichtliche Beteiligung des Enzyms an der Entstehung von Bindegewebsschwächen bei bestimmten Gefäß- und Lungenkrankheiten, wie z.B. beim Lungenemphysem im Rahmen eines α_1 -Antitrypsin-Mangels (37). Die Granulozyten-Elastase scheint aber auch eine wichtige Rolle zu spielen bei Erkrankungen, die zu schweren Gerinnungsstörungen führen. In vitro-Versuche an isolierten Gerinnungsfaktoren und in vivo-Untersuchungen an Patienten mit akuter Leukämie und Septikämie zeigten, daß eine unspezifische Proteolyse zahlreicher Gerinnungsfaktoren durch Granulozyten-Elastase stattfindet (19 - 22, 63). Daneben lieferten Untersuchungen von W i t t e (74) und J o c h u m (36)

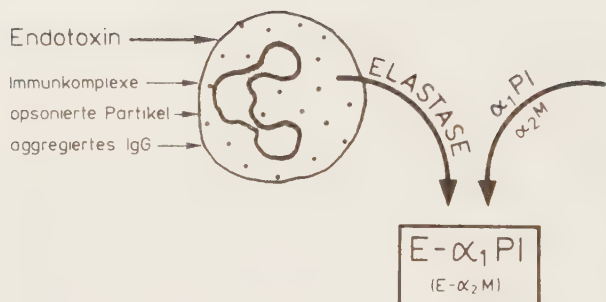


Abb.1 Extrazelluläre Freisetzung von PMN-Elastase und Komplexierung durch die Plasmaprotease-Inhibitoren α_1 -Proteinaseinhibitor ($\alpha_1\text{-PI}$) und α_2 -Makroglobulin ($\alpha_2\text{M}$) im Plasma

Hinweise, daß die Granulozyten-Elastase wahrscheinlich noch andere Plasmaproteine abbaut: Bei Patienten im septischen Schock waren neben Fibrinolyse-, Gerinnungs- und Komplementfaktoren auch die Plasmakonzentrationen von Präalbumin und Transferrin signifikant erniedrigt. In vitro-Versuche bestätigten, daß die Granulozyten-Elastase zumindest das Transferrin abzubauen vermag (41).

Daneben schien es möglich, daß auch einige I n h i b i t o r e n von Plasmaproteinasen, und hier insbesondere die im Gerinnungs- bzw. Fibrinolyse-System wirksamen Inhibitoren, durch PMN-Elastase abgebaut werden: Hinweise darauf ergaben sich aus den Untersuchungen

von D u s w a l d (19), W i t t e (74), J o c h u m (36) und A a s e n (1, 2). Die Autoren fanden stark verminderte Plasmakonzentrationen von α_2 -Antiplasmin und Antithrombin III sowohl bei Patienten wie auch bei Tieren im septischen Schock. Am Beispiel von α_2 -Antiplasmin, Antithrombin III und α_1 -Antichymotrypsin sollte nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob in vitro ein Abbau dieser Plasmaproteinase-Inhibitoren durch PMN-Elastase stattfindet.

Antithrombin III (AT III) stellt ein α_2 -Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 65 000 und einem Kohlenhydratanteil von 13% dar (14, 24, 42). Seine mittlere Plasmakonzentration beträgt 15-20 mg/100 ml (50, 64). Es kann in verschiedenem Umfang alle Serinproteasen des Gerinnungssystems außer dem Faktor VIIa (extrinsic system) inaktivieren. Von besonderer Bedeutung ist die Hemmung von Thrombin und Faktor Xa (aktivierter Faktor X) durch AT III, die in Gegenwart von Heparin (AT III-Co-Faktor) auf das 50-100fache beschleunigt wird (14, 24, 33, 39, 42, 58, 59, 64, 65, 70). Dabei entstehen Enzym-Inhibitor-Komplexe in einem Molverhältnis von 1:1, die sich durch große Stabilität auszeichnen und weder durch denaturierende noch durch reduzierende Agentien zu spalten sind (24, 33, 59). Die Komplexbildung wird begleitet vom Auftreten eines freien, proteolytisch modifizierten AT III (2-Ketten-Form des AT III), das nahezu vollständig die Fähigkeit Thrombin zu binden verloren hat und eine herabgesetzte Affinität zu Heparin zeigt (25, 26). Bei Patienten im septischen Schock oder im Endotoxinschock ist der Plasma-AT III-Spiegel stark erniedrigt, was zu einer verstärkten Thromboseneigung und damit möglicherweise mit zu einer Verbrauchs-koagulopathie bei diesen Erkrankten führt (11, 62, 74).

Der Plasmaproteinase-Inhibitor α_2 -Antiplasmin (α_2 -PI) weist ein Molekulargewicht von 67 000 und einen Kohlenhydratanteil von ca. 12% auf (4, 15, 16, 17, 43, 45, 48, 72, 73). Die normale Plasmakonzentration des α_2 -PI beträgt etwa 6 mg/100 ml (ca. 1 μ M), was im Vergleich zu an-

deren wichtigen Inhibitoren des Plasmas wie α_2 -Makroglobulin ($3,6 \mu\text{M}$) oder α_1 -Proteinaseinhibitor ($52 \mu\text{M}$) sehr niedrig ist (4, 16, 73). α_2 -PI komplexiert Plasmin, Trypsin und Urokinase in einem molaren Verhältnis von 1:1 (9, 17, 43, 45-48, 72, 73). Die entstandenen Komplexe können weder durch denaturierende noch durch reduzierende Agentien gespalten werden (17, 49). Das Plasmin wird von α_2 -PI äußerst schnell und stabil gebunden, die Reaktion mit Urokinase nimmt dagegen einen langsamen Verlauf (16, 45). Bei der Komplexbildung zwischen α_2 -PI und Plasmin bindet der Inhibitor an die B-Kette (light chain) des Plasmins, die das aktive Zentrum enthält (16, 17). α_2 -PI ist ein wesentlich stärkerer Plasmininhibitor als das α_2 -Makroglobulin (45, 48). So lassen sich α_2 -Makroglobulin-Komplexe erst nachweisen, wenn das gesamte α_2 -PI des Plasmas verbraucht ist (15). Bei Patienten mit Hyperfibrinolyse oder Leberzirrhose ist die α_2 -PI-Konzentration im Plasma stark erniedrigt (1, 2, 4, 16, 43), was für die verstärkte fibrinolytische Aktivität bei diesen Patienten spricht. Die biologische Aufgabe des α_2 -PI besteht demnach darin, die durch Plasminogenaktivatoren induzierte Fibrinolyse zu regulieren. Diese Aufgabe wird vom α_2 -PI weniger durch Hemmung der Aktivatoren (z.B. der Urokinase) als vielmehr durch Hemmung des Plasmins selbst erreicht.

α_1 -Antichymotrypsin (α_1 -Achy) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 68 000 bei einem Kohlenhydratanteil von ca. 26% (13, 31, 68). Seine mittlere Konzentration im Plasma beträgt 40 mg/100 ml (54). Bei akuten entzündlichen Prozessen kann sich die α_1 -Achy-Konzentration innerhalb von 8 Stunden verdoppeln und erreicht ihren Gipfel (bis zur 6fachen Erhöhung) noch während der frühen sog. neutrophilen Kampfphase der entzündlichen Reaktion (54, 68). α_1 -Achy bildet 1:1-Komplexe mit Chymotrypsin und den sog. kationischen leukozytären Proteasen des Menschen, wie z.B. Cathepsin G, einer chymotrypsinähnlichen Protease (40, 68, 69). Die Hauptaufgabe des α_1 -Achy scheint darin zu bestehen, die Aktivität der chymotrypsinähnlichen Proteasen, die während einer Entzündung aus den Granulozyten

freigesetzt werden, im Plasma zu regulieren. Zusammen mit dem C-reaktiven Protein (CRP) wird α_1 -Achy zu den am schnellsten reagierenden sog. Akute-Phase-Proteinen gerechnet (54, 69).

Neben dem Nachweis einer eventuellen Proteolyse von AT III, α_2 -PI und α_1 -Achy durch PMN-Elastase war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, gegebenenfalls den Abbau dieser Plasmaprotease-Inhibitoren mittels geeigneter PMN-Elastase-Inhibitoren zu hemmen. Mit dem Bowman-Birk-Inhibitor (Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen) und dem Eglin b (Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Blutegeln) standen zwei relativ spezifische PMN-Elastase-Inhibitoren zur Verfügung (10, 61, 66, 67).

2. MATERIALIEN UND GERÄTE

2.1 Materialien

α_1 -Achy, Forschungsprodukt, Behringwerke AG; Acrylamid, Serva; Agarose-Immunelektrophorese-Tabletten, BIO-RAD; Antiseren gegen α_1 -Achy, α_2 -PI, AT III und Cathepsin G, Behringwerke AG; α_2 -PI und AT III, Forschungsprodukt, Behringwerke AG; L-BAPA, Merck; BIS, Serva; Cathepsin G, Forschungsprodukt Merck; α -Chymotrypsin, Novo Industri; CNBr-aktivierte Sepharose 4B, Pharmacia; Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva; Eglin b, U. Seemüller; Farbreagens zur Proteinbestimmung, BIO-RAD; Immunelektrophoreseplatten (Plastic Plates Nr. 2117-406 oder Nr. 2117-407), LKB; PER, Serva; Plasmin, Kabi Diagnostica; SANA, Paesel, Frankfurt; Sephadex G-25 und G-75 (coarse), Pharmacia; SP-Sephadex C-25, Pharmacia; S-2238 und S-2251, Deutsche Kabi, München; S-2496, Forschungsprodukt Kabi, Mölndal; Trasylol, Bayer Werke AG, TRIS, Merck; Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen, Serva;

2.2 Geräte

Drucktopf (PARR-Bombe), FIKE, Blue Springs, MO., USA; Fraktometer, LKB; Gefriertrockner, WKF, Modell L05; Getriebe der Fraktometerpumpe, LKB; Immunelektrophoresekammer, LKB 2117, Multiphor; Photometer, Eppendorf, Typ 1101 M; Ultrafiltrationszelle, Amicon, Modell 402 (75 Psi Max.); Ultraschallgerät (Sonifier), Branson-Sonifier, Modell B-12; Zentrifugen, WKF G50K (Rotor 6 x 100 ml) und Heraeus Christ GmbH, Typ 5912 (Rotor Nr. 5710);

3. METHODEN

3.1 Isolierung der Granulozyten-Elastase

Aus menschlichem Vollblut wurden durch Kombination verschiedener Trenntechniken (Zentrifugation, Sedimentation in Dextran, Lyse der Erythrozyten) zunächst die Leukozyten isoliert. Unter Überdruck wurden dann die Zellwände der gewaschenen Leukozyten aufgebrochen und anschließend durch Zentrifugation die Leukozyten-Granula von Kernfraktion und Zytosol abgetrennt. Die Proteinextraktion aus den Granula erfolgte mit Natriumazetat-Puffer (0,2 M, pH 4,5). Die Granulozyten-Elastase wurde durch Affinitätschromatographie an einem CNBr-aktivierten Sepharose 4B-Trasylol-Harz und darauffolgende Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex C-25 (bei einer Ionenkonzentration von 0,3 - 0,55 M Na⁺) von den übrigen granulozytären Proteasen separiert. Die spezifische Aktivität der so gereinigten PMN-Elastase betrug ca. 0,3 U/mg Protein (bezogen auf die Spaltung von SANA). Die exakte Isolierungsvorschrift ist in (41) ausführlich dargestellt.

3.2 Isolierung des Bowman-Birk-Inhibitors (H. Schiessler, persönl. Mitteilung)

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung des BBI diente der Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (von SERVA). 500 mg des Rohmaterials, gelöst in ca. 6 ml 2%iger Essigsäure, wurden auf eine Chromatographiesäule mit Sephadex G-75 (coarse) aufgetragen. In den nach Elution mit 2%iger Essigsäure gesammelten Fraktionen (Fraktionsvolumen = 13 ml) wurde die Hemmaktivität gegenüber Trypsin photometrisch bestimmt (s.3.5). Die Fraktionen 89-107 enthielten den BBI. Sie wurden gesammelt und lyophilisiert. Die spezifische Hemmakti-

vität des BBI wurde zu 2,1 mIU/mg Protein bestimmt, bezogen auf die Spaltung von L-BAPA durch Trypsin.

3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden durchgeführt nach einer Vorschrift von Fehrström und Moberg (LKB Note 306, April 1977).

a) Polyacrylamid-Gelelektrophorese ohne SDS

Folgende Lösungen wurden angesetzt:

TRIS-Glycin-Stammpuffer: 75,1 g Glycin, 2,5 g Natriumazid, gelöst in 3 l H₂O, mit TRIS auf pH 8,9 titriert, mit H₂O auf 5 l aufgefüllt

Elektrodenpuffer: TRIS-Glycin-Stammpuffer 1:1 verdünnt mit H₂O

Acrylamidlösung: 22,2 g Acrylamid, 0,6 g BIS, mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt

Ammoniumpersulfatlösung: 150 mg PER/10 ml H₂O

Zusammensetzung der Polyacrylamidgele:

7,5% Polyacrylamidgel: 7,5 ml H₂O, 33,0 ml TRIS-Glycin-Puffer, 22,2 ml Acrylamidlösung, 3,2 ml PER, 0,1 ml TEMED

10% Polyacrylamidgel: 33,0 ml TRIS-Glycin-Puffer, 29,7 ml Acrylamidlösung, 3,2 ml PER, 0,1 ml TEMED

b) Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS

Folgende Lösungen wurden angesetzt:

Phosphat-Stammpuffer: 39,0 g NaH₂PO₄·H₂O, 128,15 g Na₂HPO₄·H₂O, 10,0 g SDS, mit H₂O auf 5 l aufgefüllt, 0,2 M, pH 7,1

Elektrodenpuffer: Phosphat-Stamm-puffer 1:1 verdünnt mit H_2O
Acrylamidlösung: siehe unter a)
Ammoniumpersulfatlösung: siehe unter a)
Phosphat-Probenpuffer: 10,0 ml Phosphat-Puffer (0,2 ml Mercaptoäthanol), 2,0 g SDS, mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt, 0,02 M; pH 7,0

Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele:

5% SDS-Polyacrylamidgel: 14,9 ml H_2O , 33,0 ml Phosphat-Puffer, 14,8 ml Acrylamidlösung, 3,2 ml PER, 0,1 ml TEMED
7,5% SDS-Polyacrylamidgel: 7,5 ml H_2O , 33,0 ml Phosphat-Puffer, 22,2 ml Acrylamidlösung, 3,2 ml PER, 0,1 ml TEMED
10% SDS-Polyacrylamidgel: 33,0 ml Phosphat-Puffer, 29,7 ml Acrylamidlösung, 3,2 ml PER, 0,1 ml TEMED

Vor dem Auftragen auf die SDS-Polyacrylamidgele wurden die Proben jeweils 1:1 mit Phosphat-Probenpuffer (mit Mercaptoäthanol: reduzierte Proben; ohne Mercaptoäthanol: nicht reduzierte Proben) verdünnt, für 2 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden als Horizontal-Flachgel-Elektrophorese durchgeführt. Die Dicke der Gele betrug 2 mm. Um eine bessere Auflösung zu erzielen, wurden auch Gele mit einer Dicke von 0,48 mm verwendet (30). Das aufgetragene Probenvolumen betrug 10 μ l bei den 2 mm-Gelen und 4 μ l bei den 0,48 mm-Gelen. Es wurde eine Vorelektrophorese von ca. 20 Minuten bei einer Feldstärke von 5 - 6 V/cm (für SDS-Gele 3 - 4 V/cm) durchgeführt, die Elektrophorese nach dem Auftragen der Proben dauerte 4 Stunden bei einer Feldstärke von ca. 10 V/cm (für SDS-Gele 5 Stunden bei 7 - 8 V/cm).

Sofort nach der Elektrophorese wurden die Gele für ca. 30 Minuten in 20%iger Trichloressigsäure fixiert.

Zur Färbung (ca. 2 Stunden) diente Coomassie Brilliant Blue R-250 (1,5 g Coomassie gelöst in 500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 400 ml H₂O), für die Entfärbung wurde eine Lösung aus 200 ml Methanol, 100 ml Essigsäure und 700 ml H₂O verwendet (Entfärbung dauerte ca. 24 Stunden).

3.4 Immunelektrophoresen

Die Immunelektrophoresen wurden durchgeführt nach der Vorschrift von Becker und Sieber (Methoden der qualitativen und quantitativen Immunelektrophorese, Behring Werke), C.-B. Laurell und P.O. Ganrot (Scand.J.Lab.Invest. 29, Suppl. 124, 39, 1972).

a) Rocket-Immunelektrophoresen

Für die Rocket-Immunelektrophoresen wurden Plastikfolien von LKB, Schweden (no. 2117-406; 8,4 x 9,4 cm) mit 12 ml 1%igem Agarosegel beschichtet (Agarose-Tabletten von Bio Rad in 0,25 M TRIS-Tricine-Puffer, pH 8,6). Die Konzentration des Antiserums im Agarosegel lag bei 1% für AT III, 2% für α_2 -PI und 1,5% für α_1 -Achy. Die Elektrophorese dauerte 4 Stunden bei einer Feldstärke von 8 - 10 V/cm. Als Elektrophorese-Puffer diente TRIS-Tricine-Puffer, pH 8,6 (0,08 M TRIS, 0,024 M Tricine, 0,0003 M Calciumlactat, 0,02% Natriumazid).

b) Zweidimensionale Immunelektrophorese

Bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese in 1%igem Agarosegel wurden Plastikfolien von LKB, Schweden (no. 2117-406; 8,4 x 9,4 cm und no. 2117-407; 18 x 9,4 cm) verwendet. Für zweidimensionale Immunelektrophoresen mit AT III wurden der Gelschicht in der 1. Dimension 4 Units Heparin/ml Agarosegel beigemischt. Die Elektropho-

rese in der 1. Dimension dauerte 2 Stunden bei einer Feldstärke von 8 - 10 V/cm und 4 Stunden bei 8 - 10 V/cm in der 2. Dimension. Die Gelschicht der 2. Dimension enthielt die Antisera in Konzentrationen von 1% für AT III, 2% für α_2 -PI und 0,75% für α_1 -Achy.

In die Auftragsstellen (Durchmesser 2,5 mm) wurden jeweils 5 μ l Probe eingebracht. Als Färbereagens diente Coomassie Brilliant Blue R-250 (10 g Coomassie, gelöst in 900 ml Äthanol, 200 ml Essigsäure und 900 ml H₂O).

3.5 Enzymtests

- a) Elastase-Test: Zur Bestimmung der amidolytischen Aktivität der PMN-Elastase gegenüber dem synthetischen Substrat SANA

Substrat: SANA (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA), 1,35 mg/1 ml TRA-Puffer

Puffer: TRA 0,2 M, pH 7,8

PMN-Elastase: 40 μ g PMN-Elastase/60 μ l 0,0025 N HCl

Meßdaten: Meßvolumen = 3 ml; λ = 405 nm; T = 25°C

Ansatz: 0,05 ml PMN-Elastase, 1,95 ml TRA, 1,00 ml SANA

- b) Antiplasmin-Test: Zur Bestimmung der Hemmaktivität des α_2 -PI gegenüber Plasmin

Substrat: S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), 19 mg/12 ml H₂O

Puffer: 0,05 M TRIS, 0,11 M NaCl, pH 7,4

Plasmin: 22 nkat Plasmin/10 ml Plasmin-Solvent + 40 ml TRIS-Puffer

Plasmin-Solvent: Glycerin + 0,002 N HCl (1:1)

α_2 -PI: ca. 10 μ g α_2 -PI/0,3 ml TRIS

Meßdaten: Meßvolumen = 3 ml; λ = 405 nm; T = 25°C

Ansatz: 0,4 ml Plasmin, x ml α_2 -PI, (0,4 - x) ml TRIS, 1 Minute Inkubation bei 25°C, 0,2 ml S-2251

- c) "anti"-Trypsin-Test: Zur Bestimmung der Hemmaktivität des BBI gegenüber Trypsin
- Substrat: L-BAPA, 50 mg/100 ml H₂O
- Puffer: TRA, 0,2 M, pH 7,8
- Trypsin: 10 mg Trypsin/100 ml 0,0025 N HCl
- BBI: 20 mg BBI/100 ml H₂O
- Meßdaten: Meßvolumen = 3 ml; λ = 405 nm; T = 25°C
- Ansatz: 0,1 ml Trypsin, x ml BBI, (1,9 - x) ml TRA, 5 Minuten Inkubation bei 25°C, 1,0 ml L-BAPA
- d) Antithrombin III-Test: Zur Bestimmung der Hemmaktivität des AT III gegenüber Thrombin
- Substrat: S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA x 2 HCl)
7 mg S-2238 + 5 mg Polybren/15 ml H₂O
- Heparin-Puffer: 0,5 mM TRIS, 0,0075 M Na₂EDTA, 0,175 M CaCl₂, 3000 Einheiten Heparin, pH 8,4
- Thrombin: 0,18 nkat Thrombin/100 μ l H₂O
- AT III: 25 μ g AT III/100 μ l 0,2 M TRA, pH 7,8
+ 900 μ l Heparin-Puffer
- Meßdaten: Meßvolumen = 0,8 ml; λ = 405 nm; T = 25°C
- Ansatz: 0,1 ml Thrombinlösung, x ml AT III, (0,4 - x) ml Heparin-Puffer, 5 Minuten Inkubation bei 25°C, 0,3 ml S-2238
- e) Antichymotrypsin-Test: Zur Bestimmung der Hemmaktivität des α_1 -Achy gegenüber α -Chymotrypsin
- Substrat: S-2496, 1,26 mg/1 ml H₂O
- Puffer: 0,05 M TRIS, 0,40 M NaCl, 0,003 M CaCl₂, mit 2 N HCl auf pH 7,8 titriert
- α -Chymotrypsin: 0,5 μ g α -Chymotrypsin in 100 μ l 0,001 N HCl
- α_1 -Achy: ca. 12 μ g α_1 -Achy/60 μ l TRIS
- Meßdaten: Meßvolumen = 1 ml; λ = 405 nm; T = 25°C
- Ansatz: 0,1 ml α -Chymotrypsin, x ml α_1 -Achy, (0,8 - x) ml TRIS, 5 Minuten Inkubation bei 25°C, 0,1 ml S-2496

3.6 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung diente der Bio-Rad-Protein-Assay ("Micro-assay Procedure" für 1 - 20 µg Protein).

Protein-Standards: 1,26 µg Serumalbumin/0,8 ml TRA
 2,52 µg Serumalbumin/0,8 ml TRA
 5,04 µg Serumalbumin/0,8 ml TRA
 10,08 µg Serumalbumin/0,8 ml TRA
 20,16 µg Serumalbumin/0,8 ml TRA

Proben: PMN-Elastase bzw. BBI; jeweils ca. 10 µg ein-
 gewogen und in 0,8 ml TRA gelöst

Farbreagens: Dye Reagent Concentrate von Bio-Rad

Puffer: TRA, 0,2 M, pH 7,8

Ansatz: 0,8 ml Proteinstandard bzw. Probe
 0,2 ml Dye Reagent Concentrate, 60 Minuten
 Inkubation bei 37°C

Nach 60 Minuten Inkubation wurden die Ansätze in 1 ml-Halbmikro-
küvetten umgefüllt und die Extinktion bei 595 nm im Photometer
(Zeiss) gemessen. Aus den Werten der Protein-Standards wurde eine
Standardkurve (Abszisse: µg Serumalbumin, Ordinate: Extinktion)
erstellt und der Proteingehalt der Proben aus dieser Kurve bestimmt.

4. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

4.1 Hemmung der PMN-Elastase

4.1.1 PMN-Elastase + Bowman-Birk-Inhibitor

Die Hemmaktivität des BBI gegenüber der PMN-Elastase wurde mit Hilfe des Elastase-spezifischen, chromogenen Substrates SANA ermittelt. Gleichbleibende Mengen PMN-Elastase ($30 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$) wurden mit steigenden Mengen BBI (Stammkonzentration $42 \text{ IU}/100 \text{ ml H}_2\text{O}$) jeweils 10 Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend die Elastase-Aktivität gegenüber SANA photometrisch gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 2 dargestellt. Aus der Hemmkurve läßt sich ersehen, daß ca. $30 \mu\text{g}$ BBI (entsprechend ca. 63 mIU) ausreichen, um $30 \mu\text{g}$ PMN-Elastase nahezu vollständig zu hemmen.

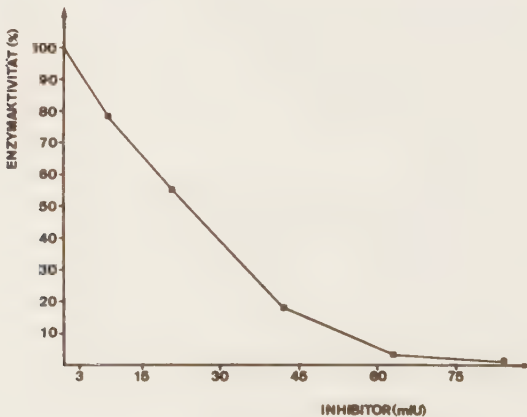


Abb.2 Titration der PMN-Elastase ($30 \mu\text{g}$) mit BBI (8 - 80 mIU)

4.1.2 PMN-Elastase + Eglin b

Die Hemmaktivität des Eglin b gegenüber PMN-Elastase wurde ebenfalls im Elastase-Test bestimmt. Die PMN-Elastase ($30\text{ }\mu\text{g}/50\text{ }\mu\text{l}$) wurde bei 25°C jeweils 10 Minuten mit verschiedenen Mengen Eglin b inkubiert (Stammkonzentration: $1\text{ }\mu\text{g}/2\text{ }\mu\text{l}$ TRA) (Abbildung 3). $12\text{ }\mu\text{g}$ der vorliegenden Eglin b-Präparation waren demnach ausreichend, um $30\text{ }\mu\text{g}$ PMN-Elastase vollständig zu hemmen.

Bei den folgenden Elastase-Hemmversuchen wurden BBI bzw. Eglin b im Überschuß zur PMN-Elastase hinzugefügt.

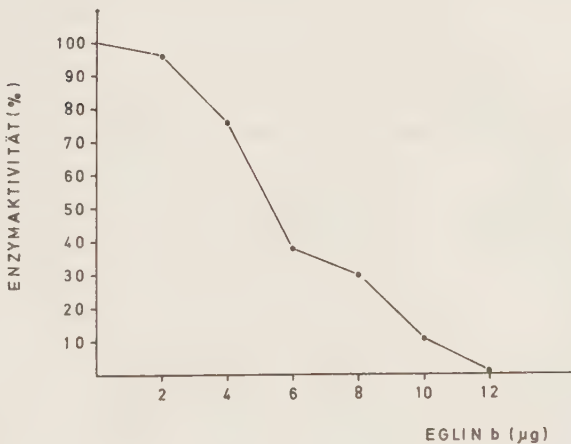


Abb.3 Titration der PMN-Elastase ($30\text{ }\mu\text{g}/50\text{ }\mu\text{l}$) mit Eglin b (2 - $12\text{ }\mu\text{g}$)

4.2 Reaktion von Antithrombin III mit PMN-Elastase

Aus Humanplasma isoliertes Antithrombin III (ein Forschungsprodukt der Behring-Werke, Marburg) wurde mit verschiedenen Mengen PMN-Elastase in Verhältnissen von 0,4, 0,01, 0,02 und 0,04 Mol PMN-Elastase pro Mol AT III bei 0, 25 und 37°C inkubiert (für die Berechnung der Molverhältnisse wurde ein Molekulargewicht von 65 000 für AT III und 30 000 für PMN-Elastase zugrunde gelegt). Die Reaktion wurde nach unterschiedlichen Zeitintervallen (5, 15 und 60 Minuten) durch Schockgefrieren der Proben in Aceton/Trockeneis gestoppt. Um den hemmenden Effekt von BBI bzw. Eglin b zu untersuchen, wurde die PMN-Elastase mit einem Überschuß an Inhibitor für 10 Minuten vorinkubiert. So sollte eine völlige Inaktivierung der PMN-Elastase vor der Inkubation mit AT III erzielt werden.

Folgende Proben wurden angesetzt (TRA-Puffer: 0,2 M TRA, pH 7,8):

Proben Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AT III (µg/100 µl TRA)	38	38	38	38	38	38	38	38	38
PMN-Elastase (µg/25 µl TRA)	-	7	0,7	0,35	0,175	7	0,7	7	0,7
BBI (µg/25 µl TRA)	-	-	-	-	-	10	1	-	-
Eglin b (µg/25 µl TRA)	-	-	-	-	-	-	-	5	0,5
TRA-Puffer (µl)	0,05	0,025	0,025	0,025	0,025	-	-	-	-
Mol PMN-Elastase/Mol AT III	-	0,4	0,04	0,02	0,01	0,4	0,04	0,4	0,04

Das Endvolumen der Proben betrug konstant 0,15 ml.

4.2.1 Enzymatische Tests

Um in den Proben die AT III-Hemmaktivität bestimmen zu können, wurde zunächst mit dem AT III-Test (siehe 3.5.d) eine Standard-Hemmkurve ermittelt (nach einer Vorschrift der Fa. Kabi): Human-Normal-Plasma oder AT III-Lösung (38 µg AT III/150 µl 0,2 M TRA) wurden 1:10 verdünnt mit Heparin-Puffer (pH 8,4, 0,5 mM TRIS, 7,5 mM Na₂-EDTA x H₂O, 175 mM NaCl, 3 000 Einheiten Heparin/l). Für weitere Verdünnungen wurden jeweils 50 µl (1,266 µg AT III) der vorverdünnten Proben mit verschiedenen Mengen Heparin-Puffer gemischt (siehe Tabelle). Zur Bestimmung der AT III-Hemmaktivität wurden je 30 µl dieser verschiedenen Lösungen mit 370 µl Heparin-Puffer, 100 µl Thrombin (0,18 nkat) und 300 µl Substrat (0,75 mM S-2238) inkubiert.

Verdünnungs- schritt	Heparin- puffer (µl)	Endgültige Testmischung	
		Proben mit Humanplasma AT III-Hemmak- tivität ⁺ (%)	Proben mit gereinigtem AT III Protein-Gehalt (ng)
1	1 150	25	31,7
2	550	50	63,3
3	350	75	95,0
4	250	100	126,7
5	190	125	158,3

⁺ Nach Angaben der Fa. Kabi Diagnostica (Stockholm) definiert.

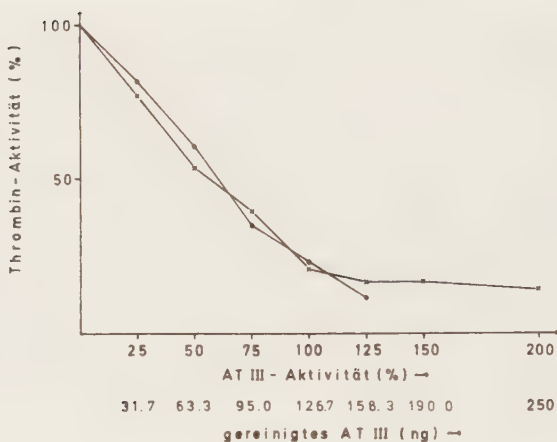


Abb.4 Hemmung von Thrombin durch AT III

Eine gleichbleibende Menge Thrombin (0,18 nkat) wurde mit gereinigtem AT III (31,7 - 158,3 ng/30 μ l) bzw. mit Humanplasma (= 25 - 125% AT III-Hemmaktivität) titriert

Für gereinigtes AT III (o—o) und Humanplasma (x—x) ergaben sich nahezu identische Hemmkurven. Um eine vollständige Hemmung der vorgegebenen Menge Thrombin (0,18 nkat) zu erzielen, war ein Überschuß an AT III über die äquimolare Enzym-Inhibitor-Rate notwendig. Im Folgenden wurde davon ausgegangen, daß 158,3 ng AT III ausreichen, um 0,18 nkat Thrombin völlig zu hemmen, d.h. 158,3 ng AT III entsprechen 100% AT III-Aktivität.

Demzufolge wurden die Proben 1 - 9 (s.o.) für den AT III-Test folgendermaßen verdünnt:

62,5 μ l Probe (= 15,83 μ g AT III) + 2,9375 ml Heparin-Puffer = 15,83 μ g AT III/3000 μ l oder 158,3 ng AT III/30 μ l

Von den verdünnten Probelösungen wurden jeweils 30 μ l, entsprechend 158,3 ng AT III im AT III-Test eingesetzt.

In Gegenwart von PMN-Elastase in einem Molverhältnis von AT III : PMN-Elastase = 1 : 0,4 (Probe 2) hatte das AT III seine Hemmaktivität gegenüber Thrombin nahezu vollständig eingebüßt (siehe Tabelle 1). Selbst bei Inkubationszeiten von weniger als 5 Minuten (dazugehörige Werte sind nicht angeführt) wurde AT III von PMN-Elastase noch zu mehr als 95% inaktiviert.

Darüberhinaus zeigte sich, daß das Ausmaß der AT III-Inaktivierung durch PMN-Elastase praktisch unabhängig von der Inkubationstemperatur war: Selbst bei 0°C wurde AT III durch PMN-Elastase noch rasch (in 15 Minuten) zu nahezu 95% inaktiviert.

Tabelle 1 Inaktivierung von AT III durch PMN-Elastase

Inkubation		AT III-Hemmaktivität (%)
Zeit (min)	Temperatur (°C)	
15	0	5,7
60	0	5,6
5	25	3,8
15	25	5,2
15	37	2,6
60	37	8,6

Dargestellt ist die Abhängigkeit von Inkubationszeit und Inkubationstemperatur bei einem Molverhältnis AT III : PMN-Elastase = 1 : 0,4 (Probe 2)

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für weitere Untersuchungen folgende Inkubationsbedingungen gewählt: Inkubationszeit 5 Minuten, Inkubationstemperatur 25°C.

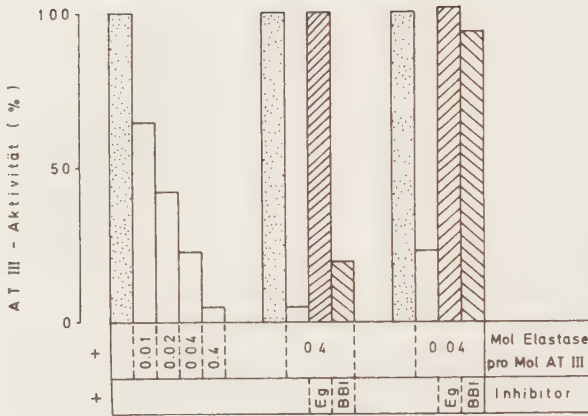


Abb.5 Inaktivierung von AT III durch PMN-Elastase

Blockdiagramm 1: Abnahme der AT III-Aktivität bei steigenden Mengen PMN-Elastase

Blockdiagramm 2+3: Hemmender Effekt von BBI bzw. Eglin B (Proben 6 - 9)

Abbildung 5 zeigt das Ausmaß der AT III-Inaktivierung in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge PMN-Elastase. Mit abnehmenden Mengen PMN-Elastase (Proben 2 - 5) wurde auch die Inaktivierung von AT III geringer (Blockdiagramm 1). Jedoch ergab sich selbst bei katalytischen Mengen PMN-Elastase (Probe 5 = 0,01 Mol PMN-Elastase : 1 Mol AT III) ein deutlicher Verlust der AT III-Hemmaktivität innerhalb von 5 Minuten bei 25°C. Diese Inaktivierung konnte durch

Zugabe von Heparin (AT III-Cofaktor) zu den Proben 2 - 5 weder verhindert noch beschleunigt werden.

Bei vorhergehender Inkubation der PMN-Elastase mit den Inhibitoren BBI oder Eglin b (Proben 6 - 9) wurde der AT III-inaktivierende Effekt der PMN-Elastase in unterschiedlichem Ausmaß aufgehoben (Blockdiagramm 2+3). In Vorversuchen wurde festgestellt, daß weder PMN-Elastase noch BBI oder Eglin b in den eingesetzten Konzentrationen den AT III-Test durch direkte Interaktion mit Thrombin beeinflussen konnten. Während Eglin b bei allen PMN-Elastase-Konzentrationen (Proben 8,9) volle Hemmaktivität gegenüber PMN-Elastase zeigte, war die Hemmaktivität des BBI in den Proben mit der höchsten PMN-Elastase-Konzentration (Probe 6) überraschend gering. Trotz eines großen Überschusses an BBI gegenüber PMN-Elastase konnte die AT III-Inaktivierung durch PMN-Elastase nicht völlig unterbunden werden.

4.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung der Proben 1, 2, 3, 6 und 8 ist in Abbildung 6 dargestellt.

Unbehandeltes AT III (Probe 1) zeigte in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese ohne SDS zwei kaum trennbare Banden. Das Auftreten der unteren (schwachen) Bande kann möglicherweise auf eine Heterogenität des AT III oder auf das Vorhandensein geringer Mengen von inaktiven Spaltprodukten zurückgeführt werden (s. 5.1, Diskussion AT III).

Ein Vergleich von Probe 1 (Nr.1) mit der Probe 2 (Nr.2 - 5) zeigt deutlich, daß bei der Inkubation des AT III mit PMN-Elastase auf dem Gel zwei zusätzliche Banden innerhalb der oberen kräftigen Bande für AT III erscheinen (die untere dieser zwei Banden ist nur schwer sichtbar und kann photographisch nicht dargestellt werden; siehe Pfeile). Die kräftigere AT III-Bande ist bei der Probe 2

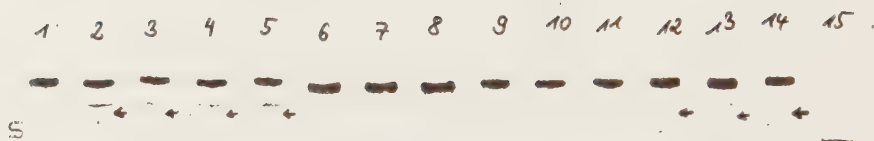


Abb.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (ohne SDS)
10% PAA, 0,48 mm dick

1	Probe 1	(reines AT III)
2-5	Probe 2	(AT III + PMN-Elastase 1 : 0,4)
6-8	Probe 8	(AT III + PMN-Elastase 1 : 0,4 + Eglin b)
9-11	Probe 6	(AT III + PMN-Elastase 1 : 0,4 + BBI)
12-14	Probe 3	(AT III + PMN-Elastase 1 : 0,4)
15		(reine PMN-Elastase)

(Nr. 2-5) im Vergleich zu reinem AT III (Nr. 1) etwas weiter nach oben gewandert, wogegen die zweite (schwache) AT III-Bande bei Probe 2 verschwunden ist. Ein Vergleich der Probe 1 mit Probe 3 (Nr. 12-14) liefert ein ähnliches Ergebnis, nur mit dem Unterschied, daß sich bei Probe 3 wieder die zweite (schwache) AT III-

Bande von der AT III-Hauptbande differenzieren läßt.

Gereinigte PMN-Elastase wanderte bei den für die Elektrophorese verwendeten Bedingungen überhaupt nicht. Dies zeigt sich bei Nr. 15, wo die PMN-Elastase in einer viel höheren Konzentration aufgetragen wurde, als sie in den Proben 2 bzw. 3 eingesetzt worden war. Bei diesen Proben (Nr. 2-5, 12-14) waren die PMN-Elastase-Konzentrationen sogar zu niedrig, um überhaupt Proteinbanden auf dem Gel zu ergeben. Demnach erscheint es als sehr unwahrscheinlich, daß die zwei zusätzlichen Banden bei den Proben 2 und 3 der PMN-Elastase zugeordnet werden können.

Eine Hemmung der PMN-Elastase durch Eglin b oder BBI vor der Inkubation mit AT III (Proben 6,8, Nr. 6-11) ergab bei der Elektrophorese ein Bild, das mit dem von unbehandeltem AT III (Nr. 1) identisch war.

Die Trennung der verschiedenen Proben durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen (nicht dargestellt) ergab für reines AT III eine einzelne Proteinbande. Bei den Proben 2 und 3 war diese kräftige AT III-Bande abgeschwächt, dafür ließ sich eine neue zusätzliche Bande von geringerer Mobilität (höheres Molekulargewicht!) erkennen. Bei vorheriger Inaktivierung der PMN-Elastase durch BBI bzw. Eglin b (Proben 6,8) wurde auf dem SDS-Gel wieder die einzelne kräftige AT III-Bande (wie für unbehandeltes AT III) sichtbar. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proben unter reduzierenden Bedingungen lieferte ein viel komplexeres Bild, dessen Interpretation weiterer Untersuchungen bedarf (nicht dargestellt). Dennoch wurde auch hier deutlich, daß bei Inkubation des AT III mit PMN-Elastase gegenüber reinem AT III zusätzliche Proteinbanden (bis zu 3 Banden) auftreten.

4.2.3 Rocket-Immunelektrophorese

Die Rocket-Immunelektrophorese der Proben 1, 2, 3, 6 und 8 ist in Abbildung 7 dargestellt. Für alle Proben (AT III, AT III + PMN-Elastase + Eglin b bzw. BBI) ergab sich jeweils nur ein Peak. Auch die Peakhöhe war bei allen Proben nahezu identisch. Dies deutet darauf hin, daß die immunologische Aktivität des AT III (im Gegensatz zu seiner inhibitorischen Aktivität gegenüber Thrombin; vgl. 4.2.1) bei Behandlung mit PMN-Elastase voll erhalten blieb.



Abb.7 Rocket-Immunelektrophorese der Proben 1, 2, 3, 6 und 8 (siehe 4.2)

Das spezifische Antiserum gegen AT III wurde in einer Konzentration von 1% zum 1%igen Agarosegel gegeben. Es wurden jeweils ca. 1,25 µg AT III in 5 µl aufgetragen.

- | | |
|--------|--|
| 1 + 2 | AT III, Probe 1 |
| 3 + 4 | AT III + PMN-Elastase, Probe 2 |
| 5 + 6 | AT III + PMN-Elastase, Probe 3 |
| 7 + 8 | AT III + PMN-Elastase + BBI, Probe 6 |
| 9 + 10 | AT III + PMN-Elastase + Eglin b, Probe 8 |

4.2.4 Zweidimensionale Immunelektrophorese

Da sich freies und mit Thrombin komplexiertes AT III in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit in Gegenwart von Heparin gut unterscheiden lassen, wurde zusätzlich zu den Proben 1, 2, 6 und 8 eine Probe hergestellt, die freies AT III und mit Thrombin komplexiertes AT III im Molverhältnis 1:1 enthielt (= Probe 10).

Probe 10: 10 μ l AT III (= 37 μ g AT III) + 90 μ l Thrombin (35 nkat)
5 Minuten inkubieren
50 μ l des Inkubationsansatzes + 10 μ l Heparin-Puffer
10 Minuten inkubieren

Die zweidimensionale Immunelektrophorese der Proben 1, 2, 6, 8 und 10 ist in Abbildung 8a - 8e dargestellt.

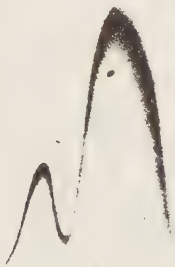


Abb. 8 Zweidimensionale Immunelektrophorese

1. Dimension: 1% Agarose mit 4 Einheiten Heparin/ml
 2. Dimension: 1% Antiserum gegen AT III
- Es wurden jeweils 1,25 μ g AT III/5 μ l aufgetragen

Abb. 8a Unbehandeltes AT III (Probe 1)



Abb.8b Freies AT III + AT III-Thrombin-Komplex



Abb.8c AT III + PMN-Elastase 1:0,4 (Probe 2)

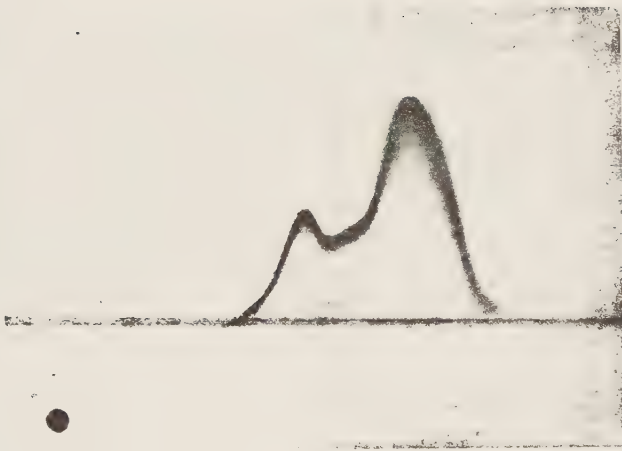


Abb.8d AT III + PMN-Elastase 1:0,4 (Probe 8)
 + Eglin b



Abb.8e AT III + PMN-Elastase 1:0,4 (Probe 6) + BBI

Probe 1 (unbehandeltes AT III) ergab auf dem Gel überraschenderweise zwei Peaks. Auch bei der Probe 10 (AT III + AT III-Thrombin-Komplex) erschienen zwei Peaks auf dem Gel; hierbei entspricht der linke Peak dem AT III-Thrombin-Komplex, der rechte läßt sich dem freien AT III zuordnen. Ein Vergleich der Probe 10 mit Probe 1 zeigt, daß demnach der (hohe) rechte Peak in Abbildung 8a dem hemmaktiven AT III (wie in Abb.8b) entspricht. Der niedrigere linke Peak ist möglicherweise vergleichbar mit dem Ergebnis der PAGE - siehe 4.2.2 - wo auch für reines AT III zusätzlich zur Hauptbande eine Bande mit geringerer Mobilität auftrat. Die Umsetzung des AT III mit PMN-Elastase im Molverhältnis 1:0,4 (Abb.8c, Probe 2) lieferte eine vollständige Wanderung des hohen Peaks von nativem AT III auf die Stelle zu, an der sich bei unbehandeltem AT III (Abb.8a) der kleinere Peak oder wie in Abb.8b der Peak für komplexiertes AT III befand. Wurde die PMN-Elastase vor der Umsetzung mit AT III durch Eglin b bzw. BBI (Proben 6, 8; Abb.8d,e) gehemmt, so erschien auf dem Gel wieder mehr (Eglin b, Abb.8d) oder weniger (BBI, Abb.8e) dasselbe Bild wie für unbehandeltes AT III.

4.3 Reaktion von α_2 -Antiplasmin (α_2 -PI) mit PMN-Elastase

Für die folgenden Versuche wurde ein mit α_2 -PI angereichertes Humanplasma verwendet, das den Plasmininhibitor im Vergleich zu einem Normalplasma (5-7 mg α_2 -PI/100 ml) in einer 18-fach höheren Konzentration (90-126 mg α_2 -PI/100 ml) enthielt. Wir gingen bei unseren Berechnungen von ca. 100 mg α_2 -PI/100 ml aus und verdünnten das angereicherte Plasma folgendermaßen:

10 μ l α_2 -PI-Plasma (ca. 10 μ g α_2 -PI) + 190 μ l TRIS (0,05 M TRIS,
0,11 M NaCl, pH 7,4)
ca. 10 μ g α_2 -PI/200 μ l

Um festzustellen, ob α_2 -PI von PMN-Elastase abgebaut wird, wurde α_2 -PI mit verschiedenen Mengen PMN-Elastase in Verhältnissen von 20, 1, 0,5, 0,2, 0,1 und 0,02 Mol PMN-Elastase pro Mol α_2 -PI inkubiert (α_2 -PI: MG = 67 000; PMN-Elastase: MG = 30 000). Gegebenenfalls sollte ein Abbau des α_2 -PI durch Elastase mittels Eglin b gehemmt werden (siehe auch 4.2). Der Probenansatz erfolgte nach dem unten stehenden Schema. Das Endvolumen betrug konstant 0,3 ml. Nach 15, 30 und 60 Minuten bei 37°C wurden je 100 μ l entnommen und die Reaktion durch Schockgefrieren der Proben in Aceton/Trockeneis gestoppt.

Proben Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
α_2 -PI (μ g/200 μ l)	10	10	10	10	10	10	10	10
PMN-Elastase (μ g/50 μ l TRIS)	-	90	4,5	2,25	0,9	0,45	0,09	90
Eglin b (μ g/50 μ l H ₂ O)	-	-	-	-	-	-	-	100
TRIS-Puffer, pH 7,4 (ml)	0,1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	-
Mol PMN-Elastase/ Mol α_2 -PI	-	20	1	0,5	0,2	0,1	0,02	20

4.3.1 Enzymatische Tests

Im α_2 -PI-Test (siehe 3.5) wurde in den Proben 1-8 die Hemmaktivität gegenüber Plasmin bestimmt. Diejenige Menge α_2 -PI, die nötig war, um die vorgegebene Plasminaktivität (0,176 nkat Plasmin/0,4 ml) nahezu vollständig zu hemmen, wurde aus einer Hemmkurve ermittelt (Abb.9).

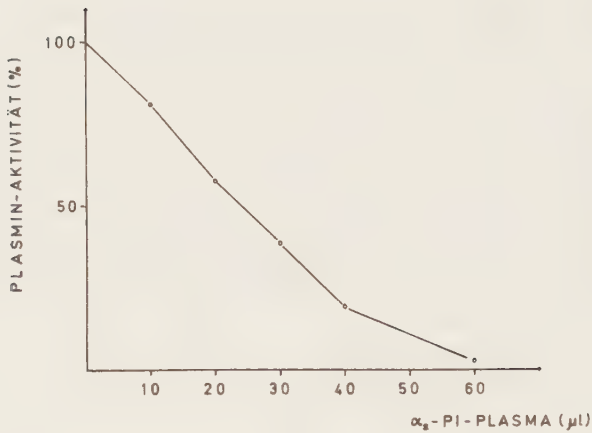


Abb.9 Titration einer konstanten Menge Plasmin (0,176 nkat/0,4 ml) mit steigenden Mengen α_2 -PI-Plasma (Stammkonzentration ca. 5 μ g α_2 -PI/200 μ l)

Aus der Hemmkurve ergab sich, daß ca. 1,5 μ g α_2 -PI (= 60 μ l α_2 -PI-Plasma) ausreichten, um 0,176 nkat Plasmin (= 0,4 ml Plasminlösung) praktisch völlig zu inaktivieren. Von den Proben 1-8, die jeweils ca. 10 μ g α_2 -PI/300 μ l enthielten, wurden demnach jeweils 40 μ l (= 1,3 μ g α_2 -PI) im Test eingesetzt.

Bei einem Molverhältnis α_2 -PI : PMN-Elastase = 1:20 (nach einer 60-minütigen Vorinkubation) war die Hemmaktivität des α_2 -PI gegenüber Plasmin bis auf ca. 6% erniedrigt. Abbildung 10 zeigt das Ausmaß der Inaktivierung des α_2 -PI in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge Elastase.

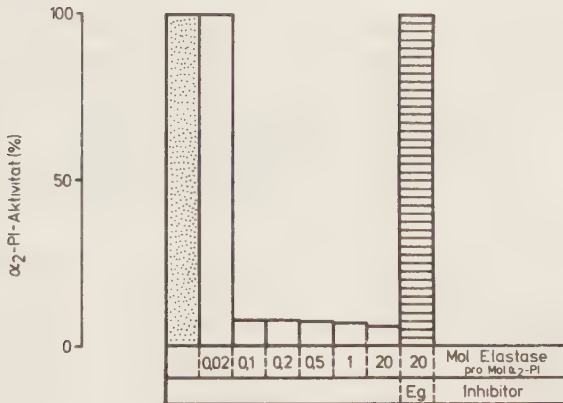


Abb.10 Inaktivierung von α_2 -PI durch PMN-Elastase
(Inkubationszeit 60 Minuten bei 37°C)

Mit abnehmenden Mengen PMN-Elastase nahm die α_2 -PI-Aktivität sehr geringfügig zu und erst bei einem Molverhältnis α_2 -PI : PMN-Elastase = 1:0,02 erlangte das α_2 -PI seine volle Hemmaktivität gegenüber Plasmin wieder. Eine Verkürzung der Inkubationszeit auf 30 bzw. 15 Minuten änderte nichts an der Inaktivierung des α_2 -PI durch PMN-Elastase.

Der α_2 -PI-inaktivierende Effekt der PMN-Elastase konnte durch Eglin b vollständig aufgehoben werden. Im Gegensatz zu BBI (siehe Versuche mit α_1 -Achy) zeigt das Eglin b gegenüber Plasmin keine Hemmwirkung. Nach vorheriger 10-minütiger Inkubation der PMN-Elastase mit Eglin b (Probe 8) war die PMN-Elastase nicht mehr in der Lage, α_2 -PI zu inaktivieren.

Eine direkte Wirkung (aktivierend oder hemmend) der PMN-Elastase auf Plasmin oder auf das im enzymatischen Test eingesetzte Substrat S-2251 konnte durch Vorversuche ausgeschlossen werden.

4.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Abbildung 11a und b zeigen die Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proben 1-7.

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zusätzlich noch ein Proteinstandard (Low Molecular Weight) der Firma Bio-Rad aufgetragen (Phosphorylase b: MG = 92 500; BSA: MG = 66 200; Ovalbumin: MG = 45 000; Carboanhydrase: MG = 31 000; Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen: MG = 21 500; Lysozym: MG = 14 400).

Für unbehandeltes α_2 -Antiplasmin (Probe 1) ergaben sich bei der PAGE zwei kräftige und zumindest zwei schwächere Banden (siehe Pfeile) mit geringerer Mobilität (das Auftreten der zusätzlichen schwächeren Banden ist möglicherweise auf Verunreinigungen des Präparates zurückzuführen). Beim Vergleich der Probe 1 (reines α_2 -PI) mit Probe 7 (α_2 -PI : PMN-Elastase = 1:0,02) ergibt sich keine Veränderung des Bandenmusters.

Vergleicht man dagegen die Probe 1 mit den Proben 6-3 (α_2 -PI : PMN-Elastase = 1:0,1 - 1:1), so erkennt man deutlich eine Änderung gegenüber dem Bandenmuster des unbehandelten α_2 -PI: Die obere der beiden kräftigen Banden der PMN-Elastase-freien α_2 -PI-Probe ist bei den Proben 6-3 verschwunden, die untere kräftige α_2 -PI-Bande nimmt mit steigenden Mengen PMN-Elastase an Intensität ab, dafür lassen sich bei den Proben 6-3 wenigstens zwei zusätzliche Banden erkennen. Die eine dieser Banden besitzt eine höhere Mobilität als die α_2 -PI-Banden und erscheint demnach oberhalb von diesen, die andere zusätzliche Bande liegt zwischen den beiden kräftigen ursprünglichen α_2 -PI-Banden. Keine dieser neu aufgetretenen Banden kann der PMN-Elastase zugeordnet werden, wie man bei Probe 2 (α_2 -PI : PMN-Elastase = 1:20) sehen kann: Hier zeigten sich in der Polyacryl-

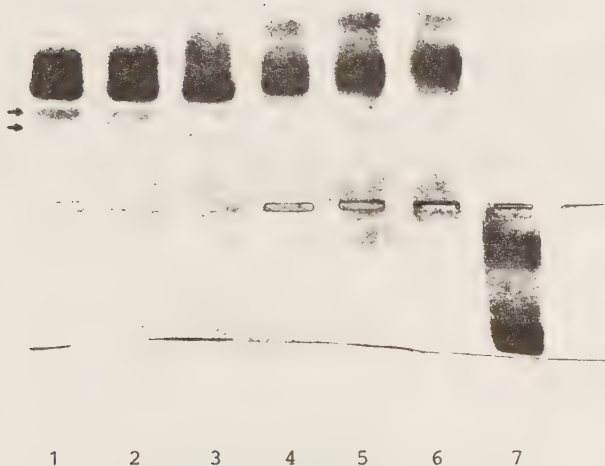


Abb. 11a Polyacrylamid-Gelelektrophorese
7,5% PAA; 2 mm dickes Gel

- | | |
|-------------|---|
| 1 = Probe 1 | (5 μg α_2 -PI) |
| 2 = Probe 7 | (5 μg α_2 -PI + 0,045 μg PMN-Elastase) |
| 3 = Probe 6 | (5 μg α_2 -PI + 0,225 μg PMN-Elastase) |
| 4 = Probe 5 | (5 μg α_2 -PI + 0,45 μg PMN-Elastase) |
| 5 = Probe 4 | (5 μg α_2 -PI + 1,12 μg PMN-Elastase) |
| 6 = Probe 3 | (5 μg α_2 -PI + 2,25 μg PMN-Elastase) |
| 7 = Probe 2 | (5 μg α_2 -PI + 45 μg PMN-Elastase) |

amid-Gelelektrophorese (Abb. 11a) vor allem die Banden der PMN-Elastase, die beim gegebenen pH-Wert und der gewählten Polung der Elektrophorese im Gegensatz zum α_2 -PI zur Kathode laufen. Daneben ist bei Probe 2 das ursprüngliche Bandenmuster des α_2 -PI vollständig verschwunden; einzig eine neue Bande mit höherer Mobilität als α_2 -PI (entsprechend den Proben 6-3) läßt sich noch erkennen.

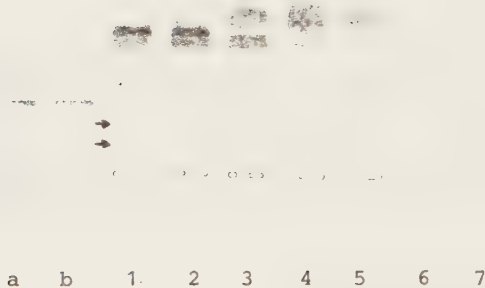


Abb. 11b SDS-PAGE (7,5%)

Proben nicht reduziert (ohne Mercaptoäthanol)

1 - 7: siehe Abb. 11a

a + b: Proteinstandard

Die SDS-PAGE liefert ein der PAGE analoges Ergebnis: Probe 1 (α_2 -PI) zeigt zwei kräftige und zwei schwächere Banden. Die beiden schwächeren Banden besitzen dabei ein höheres Molekulargewicht als die Phosphorylase b, also höher als ca. 100 000 Daltons. Der Vergleich der Probe 1 mit den Proben 6-3 beweist das Auftreten von wenigstens zwei neuen Banden mit höherer Mobilität (MG = 50 000 - 55 000) bei gleichzeitiger Auflösung der Banden des unbehandelten α_2 -PI. Bei Probe 2 (α_2 -PI : PMN-Elastase = 1:20) lassen sich wenigstens vier Banden im MG-Bereich von ca. 20 000 - 35 000 erkennen: Diese Banden entsprechen der PMN-Elastase, die sich ja aus vier Isoenzymen zusammensetzt (7, 41).

4.3.3 Rocket-Immunelektrophorese

Die Rocket-Immunelektrophorese der Proben 1, 2 und 8 ist in Abbildung 12 dargestellt.

Ebenso wie bei Antithrombin III (4.2.3) gibt die Rocket-Immunelektrophorese keinen Hinweis auf einen Abbau oder eine Komplexierung des α_2 -PI durch PMN-Elastase: Die Höhe der Peaks ist bei allen drei Proben nahezu identisch. Lediglich bei Probe 8 erscheinen die Peaks etwas höher als bei den anderen Proben.



Abb.12 Rocket-Immunelektrophorese

Das spezifische Antiserum gegen α_2 -PI wurde dem 1%igen Agarosegel in einer Konzentration von 2% zugegeben. Es wurden jeweils 0,2 μ g α_2 -PI/5 μ l aufgetragen.

1 = Probe 1 (α_2 -PI)

2 = Probe 2 (α_2 -PI + PMN-Elastase 1:20)

3 = Probe 8 (α_2 -PI + PMN-Elastase 1:20 + Eglin b)

4.3.4 Zweidimensionale Immunelektrophorese

In Vorversuchen ließ die zweidimensionale Immunelektrophorese der Proben 1-8 (siehe 3.3) keine Veränderung des α_2 -PI durch Inkubation mit PMN-Elastase erkennen. Es wurde daraufhin untersucht, ob das α_2 -PI seine Fähigkeit zur Komplexierung von Plasmin auch nach Vorbehandlung mit PMN-Elastase beibehält. Dazu wurden folgende Proben hergestellt:

Proben Nr.	1	2	3	4	5
α_2 -PI ($\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$)	10	10	10	10	10
PMN-Elastase ($\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ TRIS)	-	4,5	-	4,5	4,5
Eglin b ($\mu\text{g}/35 \mu\text{l}$ H_2O)	-	-	-	-	3
Plasmin (nkat/15 μl)	-	-	1,32	1,32	1,32
Mol PMN-Elastase/ Mol α_2 -PI	-	1	-	1	1
TRIS-Puffer (pH 7,4) ml	0,1	0,05	0,85	0,035	-

Die Proben wurden jeweils 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die eingesetzte Menge Plasmin (1,32 nkat) entsprach derjenigen Menge, die nötig ist, um ca. 10 μg α_2 -PI vollständig zu komplexieren. Sie wurde im α_2 -PI-Test (siehe 3.5) ermittelt.

Die zweidimensionale Immunelektrophorese der Proben 1-5 (von 4.3.4) ist in Abbildung 13a - e dargestellt. Unbehandeltes α_2 -PI (Probe 1, Abb.13a) ergab auf dem Gel einen einzelnen Peak. Im Vergleich mit Probe 2 (α_2 -PI + PMN-Elastase, Abb.13b) ließ sich kein Hinweis für eine Veränderung des α_2 -PI bei Vorbehandlung mit PMN-Elastase er-



Abb.13a - e Zweidimensionale Immunelektrophorese

1. Dimension: 1% Agarose
2. Dimension: 0,75% Antiserum gegen α_2 -PI
Es wurden jeweils $\sim 0,2 \mu\text{g}$ α_2 -PI/5 μl aufgetragen

Abb.13a α_2 -PI (Probe 1)

kennen: Es traten keine zusätzlichen Peaks auf, auch die Wanderungsgeschwindigkeit (Entfernung von der Auftragsstelle) blieb dieselbe. Der α_2 -PI-Plasmin-Komplex (Probe 3; Abb.13c) stellte sich als zusätzlicher Peak mit geringerer Mobilität dar. Der Peak für das freie α_2 -PI war allerdings in seiner Höhe nicht verändert, so daß angenommen werden kann, daß das α_2 -PI nur zu einem geringen Teil von der eingesetzten Menge Plasmin komplexiert wurde. Für die Proben 4 und 5 (Abb.13d,e) ergab sich überraschenderweise dasselbe Bild wie für Probe 3. Die Komplexbildung des Plasmins durch α_2 -PI ließ sich demzufolge durch Inkubation des α_2 -PI mit PMN-Elastase nicht beeinträchtigen.

Abb. 13b α_2 -PI + PMN-Elastase 1:1 (Probe 2)

Abb. 13c α_2 -PI + Plasmin (Probe 3)



Abb.13d α_2 -PI + Plasmin + PMN-Elastase 1:1 (Probe 4)

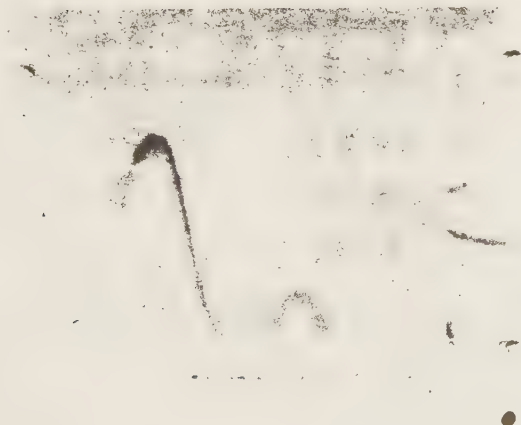


Abb.13e α_2 -PI + PMN-Elastase + Eglin b + Plasmin 1:1
(Probe 5)

4.4 Reaktion von α_1 -Antichymotrypsin mit PMN-Elastase

Es sollte zunächst untersucht werden, ob α_1 -Achy von PMN-Elastase de-gradiert wird: α_1 -Achy wurde mit verschiedenen Mengen PMN-Elastase in Verhältnissen von 0,2, 0,1, 0,05 und 0,02 Mol PMN-Elastase pro Mol α_1 -Achy für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (die Berechnung der Molver-hältnisse erfolgte ausgehend von einem Molekulargewicht von 68 000 für α_1 -Achy und 30 000 für PMN-Elastase). Ein möglicher Abbau sollte durch BBI bzw. Eglin b gehemmt werden. Eine Hemmwirkung des α_1 -Achy gegenüber PMN-Elastase konnte nicht nachgewiesen werden (69). Folgende Lösungen wurden angesetzt (TRIS: 0,05 M TRIS, 0,05 M NaCl, pH 8,0):

α_1 -Achy:	340 µg/150 µl TRIS	
PMN-Elastase:	30 µg/ 50 µl TRIS	→ 1 : 0,2
	15 µg/ 50 µl TRIS	→ 1 : 0,1
	7,5 µg/ 50 µl TRIS	→ 1 : 0,05
	3 µg/ 50 µl TRIS	→ 1 : 0,02
BBI:	35 µg/ 50 µl bidest. H ₂ O	→ 1 : 0,2
Eglin b:	20 µg/ 50 µl bidest. H ₂ O	→ 1 : 0,2

Mit diesen Lösungen wurden folgende Proben hergestellt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert (das Endvolumen der Proben betrug konstant 0,15 ml):

Proben Nr.	1	2	3	4	5	6	7
α_1 -Achy (µg/75 µl)	170	170	170	170	170	170	170
PMN-Elastase (µg/25 µl TRIS)	-	15	7,5	3,75	1,5	15	15
BBI (µg/25 µl H ₂ O)	-	-	-	-	-	17,5	-
Eglin b (µg/25 µl H ₂ O)	-	-	-	-	-	-	10
TRIS-Puffer pH 8,0, µl	75	50	50	50	50	25	25
Mol PMN-Elasta- se/Mol α_1 -Achy	-	0,2	0,1	0,05	0,02	0,2	0,2

Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Proben in Aceton/Trockeneis schockgefroren.

4.4.1 Enzymatische Tests

Mit Hilfe des α_1 -Achy-Enzymtests (3.5.e) wurde in den Proben 1 - 7 die Hemmaktivität gegenüber α -Chymotrypsin gemessen. Um eine ausgeprägte Hemmung der vorgegebenen Menge α -Chymotrypsin ($0,5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) zu erzielen, wurde die dazu notwendige Menge an unbehandeltem α_1 -Achy aus einer Hemmkurve ermittelt. (Abbildung 14).

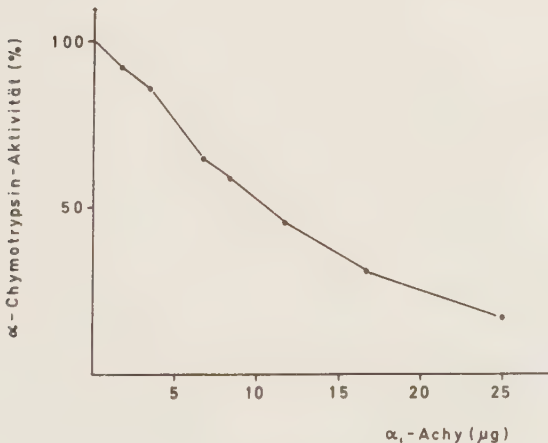


Abb.14 Titration von α -Chymotrypsin mit α_1 -Antichymotrypsin

Eine gleichbleibende Menge α -Chymotrypsin ($0,5 \mu\text{g}$) wurde mit steigenden Mengen α_1 -Achy ($1,6 - 25 \mu\text{g}$) titriert (experimentelle Details s. 3.5 Methoden)

Aus der Hemmkurve ließ sich ersehen, daß ca. 20 μg α_1 -Achy ausreichen, um die α -Chymotrypsin-Aktivität bis auf 20% zu hemmen. Demnach wurden die Proben 1 - 7 folgendermaßen für den Enzymtest verdünnt:

40 μl Probe 1 - 7 + 160 μl TRIS-Puffer $\hat{=}$ 45,3 μg α_1 -Achy/200 μl
(TRIS-Puffer: 0,05 M TRIS, 0,40 M NaCl, 0,003 M CaCl_2 , pH 7,8)

Von den verschiedenen Probenlösungen wurden jeweils 0,1 ml ($\hat{=}$ 22,7 μg α_1 -Achy) im α_1 -Achy-Test eingesetzt, nachdem festgestellt worden war, daß PMN-Elastase weder auf α -Chymotrypsin noch auf das Substrat S-2496 einen direkten Einfluß ausübt.

Es stellte sich heraus, daß α_1 -Achy in Gegenwart von PMN-Elastase seine Hemmaktivität gegenüber α -Chymotrypsin bei einem Molverhältnis α_1 -Achy : PMN-Elastase = 1 : 0,2 (= Probe 2) nahezu vollständig verloren hatte. Abbildung 15 zeigt den Grad der α_1 -Achy-Inaktivierung in Abhängigkeit von der zugefügten Menge PMN-Elastase.

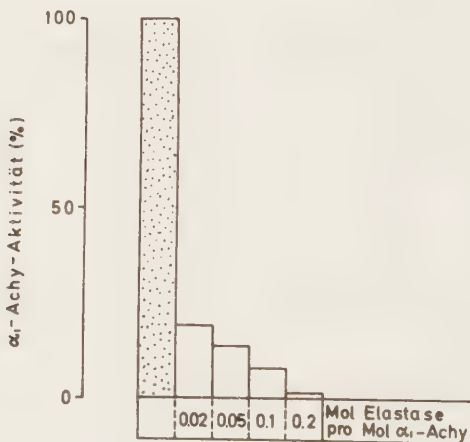


Abb.15 Inaktivierung von α_1 -Achy durch PMN-Elastase

Abnehmende Mengen PMN-Elastase führten zu einer Abnahme der α_1 -Achy-Inaktivierung, doch selbst bei einem Molverhältnis α_1 -Achy : PMN-Elastase von 1 : 0,02 war die α_1 -Achy-Aktivität noch zu ca. 80% zerstört.

Bei vorheriger Hemmung der PMN-Elastase durch BBI bzw. Eglin b (Proben 6 und 7) wurde das α -Chymotrypsin im α_1 -Achy-Test vollständig gehemmt. Da jedoch sowohl BBI als auch Eglin b starke Chymotrypsin-Inhibitoren sind (67), konnte daraus nicht eindeutig geschlossen werden, ob der Verlust der α -Chymotrypsin-Aktivität bei den Proben 6 und 7 auf α_1 -Achy oder auf BBI bzw. Eglin b zurückzuführen war.

4.4.2 Polyacrylamidgelelektrophoresen

Abbildung 16a und 16b zeigen das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung der Proben 1, 2 und 7.

Gereinigtes α_1 -Achy ergab bei der normalen Polyacrylamidgelelektrophorese zwei deutlich erkennbare Banden (Probe 1). Unterhalb der oberen starken α_1 -Achy-Bande befindet sich noch eine zusätzliche, nur schwer zu differenzierende dritte Bande (siehe Pfeile). Ein Vergleich der Proben 1 und 2 zeigt keinen deutlich nachweisbaren Abbau des α_1 -Achy durch PMN-Elastase. Lediglich die schwache (mittlere) α_1 -Achy-Bande scheint bei Probe 2 nicht mehr vorhanden zu sein, wogegen sie bei Probe 7 wieder auftritt. Die PMN-Elastase wandert bei der normalen Polyacrylamidgelelektrophorese in gegenläufiger Richtung wie das α_1 -Achy (von den Auftragstellen der Proben 2, 7 nach unten), bei Probe 7 erkennt man oberhalb der kräftigen α_1 -Achy-Bande die Bande für Eglin b, das im Überschuß zugesetzt wurde.



Abb.16a Polyacrylamidgelelektrophorese
der Proben 1, 2 und 7
(10% PAA, 2 mm dick)

- 1 = Probe 1 (11,3 μg α_1 -Achy)
 2 = Probe 2 (11,3 μg α_1 -Achy + 2 μg Elastase) $\rightarrow$ 1 : 0,2
 3 = Probe 7 (11,3 μg α_1 -Achy + 2 μg Elastase
 + 1,3 μg Eglin b) $\rightarrow$ 1 : 0,2

Auch bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ließen sich für gereinigtes α_1 -Achy zwei Banden differenzieren, wobei die untere (knapp über der Auftragstelle) nur schwach hervortritt. Im Vergleich mit Probe 1 und 7 weist die Probe 2 eine geringfügig höhere Mobilität der kräftigen α_1 -Achy-Bande auf, ein eindeutiger Nachweis einer α_1 -Achy-Degradierung ist hierdurch jedoch auch nicht gegeben.



Abb.16b SDS-Polyacrylamidgel-
elektrophorese der
Proben 1, 2 und 7
(Proben nicht mit Mer-
captoäthanol reduziert)

1 - 3: siehe Abb.16a

Die Polyacrylamidgelelektrophoresen ergaben demnach weder einen deutlichen Hinweis für einen Abbau des α_1 -Achy durch PMN-Elastase, noch für eine Komplexbildung des α_1 -Achy mit PMN-Elastase. Da aus den Enzymtests (4.4.1) jedoch ersichtlich war, daß das α_1 -Achy in Gegenwart von PMN-Elastase seine Hemmaktivität gegenüber α -Chymotrypsin einbüßt, erschien es möglich, daß unter dem Einfluß der PMN-Elastase das α_1 -Achy die Fähigkeit zur Komplexbildung des α -Chymotrypsin verliert. Die Komplexe zwischen α_1 -Achy und α -Chymo-

trypsin bzw. Cathepsin G können bei der Polyacrylamidgelelektrophorese als Komplexbanden sichtbar gemacht werden und somit war es möglich, die obige Vermutung zu überprüfen. In Vorversuchen wurden diejenigen Mengen α -Chymotrypsin bzw. Cathepsin G bestimmt, die erforderlich waren, um die Komplexe mit α_1 -Achy auf der Polyacrylamidgelelektrophorese deutlich sichtbar zu machen.

Folgende Lösungen wurden hergestellt (TRIS: pH 8,0):

α_1 -Achy:	340 μ g/150 μ l TRIS	
PMN-Elastase:	30 μ g/ 50 μ l TRIS	$\rightarrow 1 : 0,2$
α -Chymotrypsin:	6,25 μ g/ 5 μ l TRIS	
Cathepsin G:	6 μ g/ 5 μ l TRIS	
Eglin b:	20 μ g/ 50 μ l bidest. H ₂ O	$\rightarrow 1 : 0,2$

Mit diesen Lösungen wurden folgende Proben hergestellt (Endvolumen 0,15 ml, α_1 -Achy-Konzentration 0,17 mg/150 μ l): Siehe Seite 47.

Abbildung 17a und 17b zeigen das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung der Proben 1 - 11.

Die Proben 1 - 3 wurden bereits bei Abbildung 16a,b besprochen.

α -Chymotrypsin (Probe 4) läßt sich in der aufgetragenen Konzentration (entsprechend der Konzentration des α -Chymotrypsin in den Proben 6 - 8) auf dem Polyacrylamidgel überhaupt nicht erkennen, Cathepsin G (Probe 5) dagegen ergibt eine deutliche verschmierte Bande in entgegengesetzter Laufrichtung unterhalb der Auftragstelle. Bei Probe 6 (α_1 -Achy + α -Chymotrypsin) tritt im Vergleich mit Probe 1 (α_1 -Achy) eine kräftige zusätzliche Bande zwischen den beiden (bereits bei Abb.16 besprochenen) α_1 -Achy-Banden auf. Diese zusätzliche Bande kann dem Komplex zwischen α_1 -Achy und α -Chymotrypsin zugeordnet werden. Nach vorheriger Inkubation des α_1 -Achy mit PMN-Elastase im Molverhältnis 1 : 0,2 (Probe 7) tritt die Komplexbande für den α_1 -Achy- α -Chymotrypsin-Komplex nicht mehr in Erscheinung. Wurde die PMN-Elastase jedoch durch Eglin b gehemmt (Probe 8), so läßt sich die Komplexbande wieder eindeutig differenzieren.

Herstellung der Proben 1 - 11 für die elektrophoretische Trennung (siehe Seite 46)

Proben Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
α_1 -Achy ($\mu\text{g}/75 \mu\text{l}$ TRIS)	170	170	170	-	-	170	170	170	170	170	170
PMN-Elastase ($\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$)	-	15	15	-	-	-	15	15	-	15	15
Eglin b ($\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$)	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	10
α -Chymotrypsin ($\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$)	-	-	-	6,25	-	6,25	-	6,25	-	-	-
Cathepsin G ($\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$)	-	-	-	-	6	-	-	-	6	-	6
TRIS (μl)	75	50	25	145	145	70	45	20	70	45	20
Mol α_1 -Achy/ Mol PMN-Elastase	-	1:0,2	1:0,2	-	-	-	1:0,2	1:0,2	-	1:0,2	1:0,2

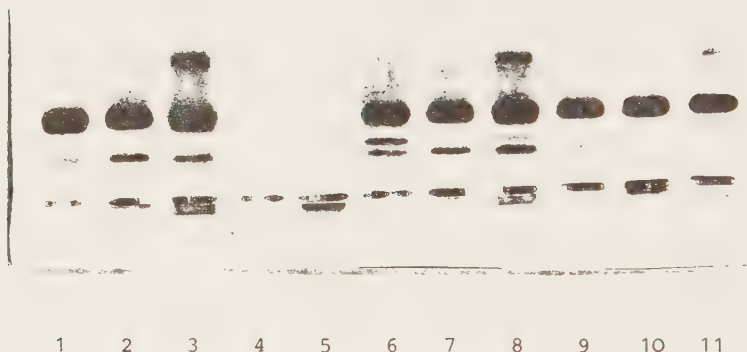


Abb.17a Polyacrylamidgelelektrophorese der Proben 1 - 11
(10% PAA, 2 mm dick)

- | | | |
|----|----------|---|
| 1 | Probe 1 | (11,3 µg α_1 -Achy) |
| 2 | Probe 2 | (11,3 µg α_1 -Achy + 2 µg Elastase) |
| 3 | Probe 3 | (11,3 µg α_1 -Achy + 2 µg Elastase
+ 1,3 µg Eglin b) |
| 4 | Probe 4 | (0,42 µg α -Chymotrypsin) |
| 5 | Probe 5 | (0,4 µg Cathepsin G) |
| 6 | Probe 6 | (11,3 µg α_1 -Achy + 0,42 µg α -Chymotrypsin) |
| 7 | Probe 7 | (11,3 µg α_1 -Achy + 2 µg Elastase
+ 0,42 µg α -Chymotrypsin) |
| 8 | Probe 8 | (11,3 µg α_1 -Achy + 2 µg Elastase
+ 1,3 µg Eglin b + 0,42 µg α -Chymotrypsin) |
| 9 | Probe 9 | (11,3 µg α_1 -Achy + 0,4 µg Cathepsin G) |
| 10 | Probe 10 | (11,3 µg α_1 -Achy + 2 µg Elastase
+ 0,4 µg Cathepsin G) |
| 11 | Probe 11 | (11,3 µg α_1 -Achy + 2 µg Elastase
+ 1,3 µg Eglin b + 0,4 µg Cathepsin G) |

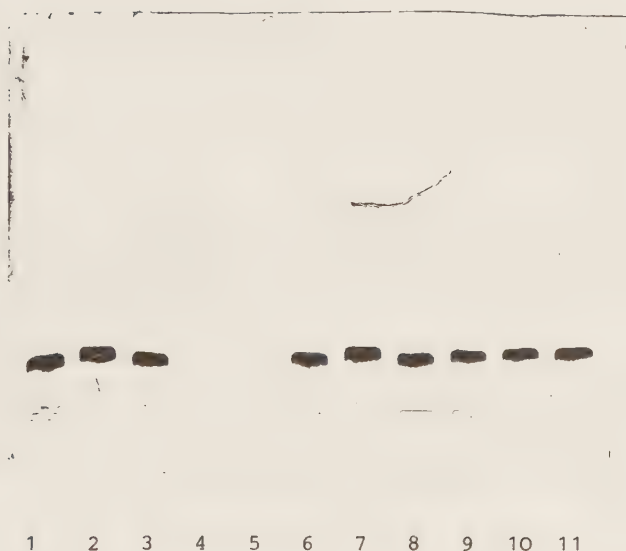


Abb.17b SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Proben 1 - 11
(Proben nicht mit Mercaptoäthanol reduziert)

Proben 1 - 11: siehe Abb.17a

Bei Probe 8 sieht man auf dem Polyacrylamidgel oberhalb der starken α_1 -Achy-Bande die Bande für Eglin b (gilt auch für die Proben 3 und 11). PMN-Elastase ergibt eine verwaschene Bande unterhalb der Auftragstelle (dies gilt für die Proben 2, 3, 7, 8, 10, 11). Der Komplex zwischen α_1 -Achy und Cathepsin G (Probe 9) ließ sich nur schwach darstellen: bei Probe 9 ist die Komplexbande (etwa in gleicher Höhe wie die Komplexbande für α_1 -Achy und α -Chymotrypsin, Proben 6, 8) nur sehr undeutlich ausgeprägt. Auf dem Original-Polyacrylamidgel konnte sie dennoch eindeutig identifiziert werden.

Nach Vorinkubation des α_1 -Achy mit PMN-Elastase (Probe 10) war diese Bande verschwunden, trat aber auch bei Hemmung der PMN-Elastase mit Eglin b (Probe 11) nicht mehr in Erscheinung. Möglicherweise hat Cathepsin G mit überschüssigem Eglin b reagiert und nicht mit α_1 -Achy.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese lieferte ein ganz ähnliches Ergebnis wie die normale Polyacrylamidgelelektrophorese. Eindeutig zu erkennen sind bei den Proben 6 und 8 die zusätzliche Bande für den Komplex zwischen α_1 -Achy und α -Chymotrypsin, ebenso wie diese Bande nach Vorinkubation des α_1 -Achy mit PMN-Elastase verschwindet. PMN-Elastase, Eglin b, α -Chymotrypsin und Cathepsin G ergaben entsprechend ihrem Molekulargewicht und der aufgetragenen Menge bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nur schwach ausgeprägte Banden oberhalb der kräftigen α_1 -Achy-Bande.

4.4.3 Rocket-Immunelektrophorese

Die Rocket-Immunelektrophorese der Proben 1 - 11 (siehe Abschnitt 4.4.2) ist in Abbildung 18 dargestellt.

Die Proben 4 und 5 (α -Chymotrypsin bzw. Cathepsin G) reagierten - wie zu erwarten war - mit dem spezifischen Antiserum gegen α_1 -Achy (von Behring) nicht. Ansonsten lieferte die Rocket-Immunelektrophorese kein eindeutig interpretierbares Ergebnis. Man erkennt lediglich, daß die Peaks bei den Proben 2, 7 und 10, in denen jeweils α_1 -Achy mit PMN-Elastase vorinkubiert wurde, am höchsten ausgebildet sind. Dies weist möglicherweise auf einen Zusammenhang mit dem Ergebnis der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese hin, wo bei denselben Proben die kräftigere α_1 -Achy-Bande eine erhöhte Mobilität aufzeigte. Ein Abbau des α_1 -Achy durch PMN-Elastase war jedenfalls sicher nicht nachzuweisen. Die Komplexierung des α_1 -Achy mit α -Chymotrypsin (Proben 6 - 11) hatte ebenfalls keinen nennenswerten Einfluß auf die Peakhöhe.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Abb.18 Röset-Immunelektrophorese der Proben 1 - 11
Das spezifische Antiserum gegen α_1 -Achy wurde dem 1%igen Agarosegel in einer Konzentration von 1,5% zugefügt. Es wurden jeweils ca. 0,57 μg α_1 -Achy/5 μl aufgetragen.
Proben 1 - 11: siehe Abbildung 17a

4.4.4 Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die Abbildungen 19a - 19f zeigen die zweidimensionale Immunelektrophorese der Proben 1, 2, 6, 7, 9 und 10 (siehe Abschnitt 4.4.2). Sie brachte ebenfalls im Vergleich zu den enzymatischen Untersuchungen unerwartete Ergebnisse. Weder konnten die Komplexe des α_1 -Achy mit α -Chymotrypsin bzw. Cathepsin G dargestellt werden, noch war beim Vergleich der Proben 1 und 2 irgendeine Veränderung

des α_1 -Achy-Peaks nach Vorinkubation des α_1 -Achy mit PMN-Elastase (Probe 2) nachzuweisen. Auch die Entfernung der Peaks von der Auftragsstelle in der 1. Dimension (mit schwarzem Punkt markiert) blieb unverändert. Selbst nach Zugabe von verschiedenen Mengen Heparin in der 1. Dimension, Veränderung der Konzentrationen von α -Chymotrypsin bzw. Cathepsin G in den Proben und bei Verwendung von Antiseren gegen Cathepsin G konnten die Komplexe nicht auf dem Gel erfaßt werden. Eine ursächliche Begründung kann hierfür nicht gegeben werden.



Abb. 19a - f Zweidimensionale Immunelektrophorese der Proben 1, 2, 6, 7, 9 und 10
1. Dimension: 1% Agarose
2. Dimension: 0,75% Antiserum gegen α_1 -Achy
Es wurden jeweils ca. 0,57 μ g α_1 -Achy/5 μ l aufgetragen.

Abb. 19a α_1 -Achy



Abb.19b α_1 -Achy + PMN-Elastase (1 : 0,2)



Abb.19c α_1 -Achy + α -Chymotrypsin



Abb.19d α_1 -Achy + PMN-Elastase (1 : 0,2) + α -Chymotrypsin



Abb.19e α_1 -Achy + Cathepsin G

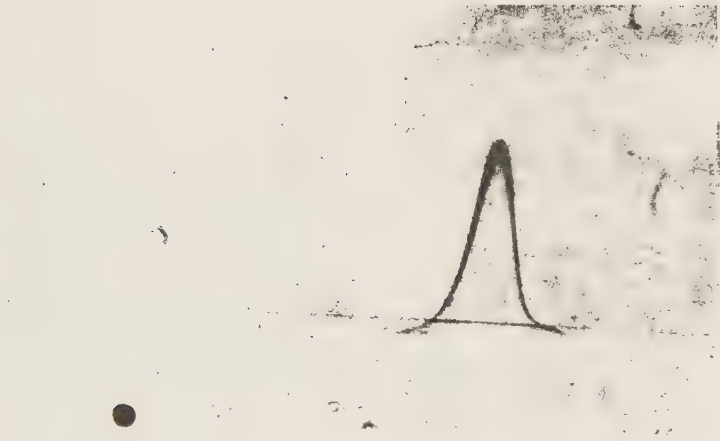


Abb.19f α_1 -Achy + PMN-Elastase (1 : 0,2) + Cathepsin G

5. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Degradierung der Plasmaproteinasen-Inhibitoren AT III, α_2 -Antiplasmin und α_1 -Antichymotrypsin durch PMN-Elastase in vitro nachzuweisen und gegebenenfalls diesen Abbau mit PMN-Elastase-Inhibitoren (Eglin b, BBI) zu hemmen. Die proteolytische Aktivität der PMN-Elastase gegenüber Faktoren des Gerinnungs- und Immunsystems (in vitro und in vivo) wurde bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen (20, 21, 22).

Eigene in vitro-Untersuchungen (41) bestätigten einen Abbau des Plasmatransportproteins Transferrin durch PMN-Elastase.

5.1 Umsetzung von AT III mit PMN-Elastase

Als wichtigster Inhibitor der Gerinnungsfaktoren hat AT III eine lebensnotwendige Bedeutung für die Homöostase des Gerinnungssystems. Der angeborene (erbliche) oder erworbene AT III-Mangel führt normalerweise zu einer erhöhten Thromboseneigung. Danach ist der Verbrauch oder die Inaktivierung des AT III durch die bei bestimmten Erkrankungen wie Leukämie, Sepsis, Endotoxinschock vermehrt in den Kreislauf abgegebenen Proteasen von großem medizinischen Interesse (28).

Isoliertes AT III wurde in verschiedenen Molverhältnissen mit PMN-Elastase umgesetzt. Hierdurch wurde der Hemmstoff von PMN-Elastase sehr rasch inaktiviert und verlor somit seine inhibitorische Kapazität gegenüber der amidolytischen Aktivität des

Thrombins (4.2.1, Abb.5). Sogar katalytische Mengen PMN-Elastase waren unter den vorliegenden Bedingungen wirksam: AT III verlor 35 bzw. 80% seiner Hemmaktivität innerhalb von 5 Minuten bei 25° C in Gegenwart von 1 bzw. 4 Mol PMN-Elastase pro 100 Mol AT III. Die Funktionsfähigkeit des gereinigten AT III wurde bewiesen durch die Übereinstimmung der Hemmkurven, die für reines (isoliertes) AT III und Kontroll-Plasma erhalten wurden (4.2.1, Abb. 4).

Die Inaktivierung des AT III mit 40 Mol PMN-Elastase pro 100 Mol AT III diente dazu, innerhalb kurzer Zeit eine vollständige Degradierung zu erzielen, und um zu sehen, ob im Anschluß hieran noch weitere Reaktionen ablaufen. Polyacrylamidgelelektrophorese (4.2.2, Abb.6) und Rocket-Immunelektrophorese (4.2.3, Abb.7) zeigten, daß trotz totalen Hemmverlustes durch die PMN-Elastase AT III in seiner molekularen Struktur nicht drastisch beeinträchtigt wurde. Ergebnisse genauerer Untersuchungen mit Hilfe der HPLC (M. Jochum und R. Geiger, unveröffentlichte Beobachtungen) wiesen darauf hin, daß nicht mehr als zwei Peptidbindungen gespalten wurden. Ein derart begrenzter Abbau würde auch die Ähnlichkeit der elektrophoretischen Beweglichkeit und des immunologischen Verhaltens von modifiziertem und nativem AT III erklären.

Andererseits weist die Änderung der elektrophoretischen Mobilität beim modifizierten AT III (verglichen mit reinem AT III) in Gegenwart von Heparin (4.2.4, Abb.8a,c) darauf hin, daß die Heparin-Bindungsstellen des AT III durch die mit PMN-Elastase induzierte Peptidspaltung (oder -spaltungen) modifiziert oder sogar völlig abgetrennt werden. Bemerkenswerterweise besitzt das mit PMN-Elastase vorinkubierte AT III in Gegenwart von Heparin eine ähnliche elektrophoretische Mobilität wie der AT III-Thrombin-Komplex (4.2.4, Abb.8b). Als Ursache für die unterschiedliche Mobilität von nativem und komplexiertem AT III ist anzunehmen, daß sie

durch qualitative oder quantitative Unterschiede bei der Bindung von Heparin an freies bzw. komplexiertes AT III zustande kommt (3, 25, 26). Der Grund hierfür scheint im Auftreten eines proteolytisch modifizierten Inhibitors im Komplex zu liegen, denn der freie modifizierte (inaktive) Inhibitor zeigt ebenfalls eine deutlich reduzierte Affinität zu Heparin (27). Es kann demnach vermutet werden, daß diejenigen Peptidbindungen im AT III, die bei der Umsetzung mit PMN-Elastase gespalten werden, zumindest nahe verwandt, wenn nicht sogar identisch sind. Diese Annahme würde auch zwei weitere Beobachtungen erklären: 1. Das Auftreten der zweiten (kaum abzutrennenden) Protein-Bande bei der normalen Polyacrylamidgelelektrophorese des unbehandelten AT III (4.2.2, Abb.6) könnte auf die Anwesenheit eines proteolytisch modifizierten AT III in unserem gereinigten AT III-Präparat hinweisen. 2. Die Tatsache, daß unbehandeltes AT III bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese (mit Heparin in der 1. Dimension) zwei Peaks ergibt (4.2.4, Abb.8a) stimmt mit den Beobachtungen Barrowcliffe's (6) überein: Er erhielt vergleichbare Ergebnisse bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese von verschiedenen Proben mit gereinigtem AT III und stellte fest, daß ein Teil des AT III kein Heparin bindet und demnach dem langsamer wandernden der beiden Peaks entsprechen müßte. Ob diese nicht Heparin-bindende AT III-Fraktion biologisch noch aktiv ist, ist bislang jedoch unklar (6).

Die Natur des modifizierten AT III wird von erst in den letzten Jahren durchgeführten Untersuchungen näher beleuchtet. Gleichzeitig mit der Bildung des AT III-Thrombin-Komplexes entsteht eine proteolytisch modifizierte (inaktive) Form des AT III (25). Sie besteht aus zwei Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (26). Dieses modifizierte AT III konnte von dem gleichermaßen inaktiven AT III, das bei der Dissoziation des AT III-Thrombin-Komplexes freigesetzt wird, nicht unterschieden werden. Es kann demnach angenommen werden, daß bei

der Komplexbildung des AT III mit Thrombin zumindest ein Teil des AT III durch Thrombin proteolytisch angegriffen wird. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für die Komplexbildung zwischen AT III und Trypsin (44).

Andererseits konnte erst kürzlich gezeigt werden, daß Proteinase-Inhibitoren durch die von ihnen nicht hemmbaren Proteinasen bevorzugt an den Peptidbindungen ihrer reaktiven Zentren gespalten werden (23). Dies trifft z.B. für die Reaktion mit α_1 -Antitrypsin zu (8). Ähnliches könnte auch für das PMN-Elastase-AT III-System der Fall sein. Obwohl AT III gegenüber PMN-Elastase nicht die geringste Hemmaktivität besitzt, wird die Peptidbindung im aktiven Zentrum des AT III anscheinend durch PMN-Elastase gespalten. Zur Absicherung dieser Vermutung sind noch detailliertere Untersuchungen erforderlich.

Wenn auch Ergebnisse aus in vitro-Untersuchungen mit Vorsicht auf in vivo-Bedingungen zu übertragen sind, so kann dennoch angenommen werden, daß zumindest ein Teil des massiven AT III-Verbrauchs bei Septikämikern oder Patienten im Endotoxinschock durch die Proteolyse des AT III durch vermehrt freigesetzte granulozytäre Proteasen verursacht wird (35). Diese Vorstellung wird dadurch noch bekräftigt, daß bei einer experimentell erzeugten Endotoxinämie das Ausmaß des AT III-Verlustes durch systemische Zuführung des PMN-Elastase-Hemmstoffes BBI stark reduziert werden konnte (35). BBI (61) und insbesondere Eglin b (66), der stärkste uns zur Verfügung stehende Inhibitor von PMN-Elastase und Cathepsin G, erwiesen sich auch in der vorliegenden Untersuchung als äußerst wirksame Hemmstoffe zur Verhinderung des AT III-Abbaues. Durch Gabe dieser beiden Elastase-Inhibitoren in der Frühphase der Septikämie könnte man möglicherweise nicht nur höchst effektiv die unspezifische Proteolyse von Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplementfaktoren stoppen, sondern darüberhinaus auch die Inaktivierung körpereigener Protease-Inhibitoren durch granulozytäre Proteasen wie der PMN-Elastase.

Voraussetzung dafür wäre unter anderem, daß die Elastase-Inhibitoren als hochgereinigte und für den menschlichen Organismus verträgliche Präparate zur Verfügung stehen.

5.2 Umsetzung von α_2 -PI mit PMN-Elastase

α_2 -PI ist ein Proteinase-Inhibitor des Plasmas, der äußerst wirksam die von Plasminogenaktivatoren (z.B. Urokinase) eingeleitete Fibrinolyse durch Komplexbildung des gebildeten Plasmins hemmt. Daneben scheint es möglich, daß α_2 -PI an der Regulation der Kallikrein-Aktivität im Plasma beteiligt ist (47). Keine der menschlichen Granulozyten-Proteasen wird von α_2 -PI gebunden (56).

α_2 -PI wurde mit verschiedenen Mengen PMN-Elastase in vitro inkubiert. Bei einem Molverhältnis α_2 -PI : PMN-Elastase = 1:20 hatte das α_2 -PI seine Hemmaktivität gegenüber Plasmin zu ca. 95% eingebüßt. Mit abnehmenden Mengen PMN-Elastase wurde α_2 -PI geringfügig weniger inaktiviert, bis dann bei einem Verhältnis von 1 Mol α_2 -PI : 0,02 Mol PMN-Elastase überhaupt keine Wirkung der PMN-Elastase auf α_2 -PI mehr nachgewiesen werden konnte. Eine Variierung der Inkubationsdauer zwischen 15 und 60 Minuten brachte dabei keine Veränderung im proteolytischen Verhalten der PMN-Elastase. Die Inaktivierung des α_2 -PI durch PMN-Elastase ließ sich durch eine kurze Vorinkubation der PMN-Elastase mit Eglin b eindeutig hemmen.

In der Polyacrylamidgelelektrophorese und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (4.3.2, Abb. 11a und b) konnte das Ergebnis der enzymatischen Tests klar bestätigt werden, wobei mit steigenden Mengen PMN-Elastase eine stärkere Spaltung des α_2 -PI-Präparates zu beobachten war. Für diese unbehandelte α_2 -PI-angereicherte Plasmafraktion ergaben sich bei den Gelelektrophoresen zwei Banden mit Molekulargewichten von ca. 65 000 und 60 000. Dies wird auch durch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Gramse, M., Egbring, R. und Havemann, K., Clemmensen et al.) bestätigt, wonach die Proteinfraction mit

Molekulargewicht 65 000 offensichtlich den nicht-Plasminogen-bindenden Teil des α_2 -PI darstellt und die Bande mit Molekulargewicht 60 000 dem inaktiven α_2 -PI entspricht. Die zwei zusätzlichen schwächeren Banden der verwendeten α_2 -PI-Präparation (siehe Abb. 11a und b) müssen dagegen wohl auf Verunreinigungen mit anderen Plasmaproteinen zurückgeführt werden.

Die Darstellung des Komplexes zwischen α_2 -PI und Plasmin in der Polyacrylamidgelelektrophorese war aufgrund einer ebenfalls starken Verunreinigung des uns zur Verfügung stehenden Plasmin mit weiteren Plasmaproteinen nicht durchführbar. Die Ergebnisse von enzymatischen Tests und Polyacrylamidgelelektrophorese bzw. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese lassen dennoch vermuten, daß bei der Proteolyse des α_2 -PI durch PMN-Elastase diejenigen Peptidbindungen, die für eine korrekte dreidimensionale Struktur zur Bindung des Plasmins notwendig sind, gespalten werden.

Die Rocket-Immunelektrophorese brachte im Gegensatz zur Polyacrylamidgelelektrophorese und Enzymtests keinen Hinweis auf eine Degradierung des α_2 -PI durch PMN-Elastase. Demnach scheinen die antigenen Determinanten des α_2 -PI bei der Umsetzung mit Elastase nicht wesentlich beeinträchtigt zu werden.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mittels der Polyacrylamidgelelektrophorese ließen sich unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen α_2 -PI in der 2-dimensionalen Immunelektrophorese die Komplexe zwischen α_2 -PI und Plasmin sehr gut darstellen. Jedoch waren auch bei Vorinkubation von α_2 -PI mit PMN-Elastase die α_2 -PI-Plasmin-Komplexe noch eindeutig nachweisbar und auch die Menge an gebildetem Komplex (ersichtlich aus der Peakhöhe) erschien unverändert. Selbst die elektrophoretische Mobilität der Komplexe wurde offensichtlich durch Elastase nicht beeinflusst. Dies wurde bereits von Ohlsson und Collen (56) beobachtet.

α_2 -PI wird von PMN-Elastase wohl bis zu einem Molverhältnis von 1:0,1 in seiner Hemmaktivität beeinträchtigt. Bei einem Molverhältnis α_2 -PI : Elastase = 1:0,02 läßt sich keine Reaktion mehr feststellen. Dies widerspricht den Beobachtungen von Gramse, Egbring und Havemann, die selbst bei einem Verhältnis von 1 Mol α_2 -PI : 1 Mol Elastase einen starken Abbau des α_2 -PI beschrieben. Dennoch erscheint es auch nach unseren Ergebnissen möglich, daß unter in vivo-Bedingungen, die zu einer erhöhten Freisetzung von PMN-Elastase ins menschliche Plasma führen (z.B. Trauma, Endotoxinschock, usw.), die Proteolyse des α_2 -PI durch PMN-Elastase eine erhöhte Plasminaktivität und damit eine Hyperfibrinolyse zur Folge hat. So konnte Dittmer (18) einen Anstieg der Fibrinogenspaltprodukte in der akuten Phase bei polytraumatisierten Patienten nachweisen. Die Fibrinogenspaltprodukte können, wie klinische und tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, ein Lungenversagen auslösen, daneben führt eine lokale Hyperfibrinolyse zu einer gestörten Wundheilung.

Durch Hemmung des Plasmin mit dem Proteinaseinhibitor Aprotinin (Trasylo^R) in geeigneter Konzentration war es Dittmer möglich, die Hyperfibrinolyse zu verhindern. Ein anderer therapeutischer Ansatzpunkt wäre aufgrund unserer Untersuchungen die Hemmung der PMN-Elastase, um einen möglichen Abbau des α_2 -PI und eine dadurch gesteigerte Hyperfibrinolyse zu verhindern.

5.3 Umsetzung von α_1 -Achy mit PMN-Elastase

Zusammen mit α_1 -PI, Inter- α -Trypsin-Inhibitor und α_2 -Makroglobulin bildet das α_1 -Achy einen ersten "Abwehrriegel" gegenüber denjenigen Proteasen, die aus den leukocytyären Granula während der Phagocytose körperfremder Substanzen oder beim Zelluntergang freigesetzt werden (68). Bei entzündlichen Prozessen, bei denen PMN-Leukocyten eine bedeutende Rolle spielen, steigt der Plasmaspiegel von α_1 -Achy äußerst schnell an, und kann innerhalb von acht Stunden das Doppelte des Ausgangswertes erreichen, wogegen sich die α_1 -PI-Konzentration erst nach drei Tagen verdoppelt. Der Spiegel des α_1 -Achy im Plasma von Patienten mit rheumatischer Arthritis (38) und bei Frauen gegen Ende der Schwangerschaft in der Amnionflüssigkeit (13) ist deutlich erhöht, ebenso nach Traumata verschiedener Genese wie Myokardinfarkt, aseptischen Nekrosen und nach akuten bakteriellen Infektionen (12). Ryley und Brogan (60) fanden auch, daß α_1 -Achy im Lumen der Bronchien von Patienten mit chronischer Bronchitis selektiv angereichert wurde: Die relative Konzentration des α_1 -Achy im Bronchialsekret war signifikant höher als die der anderen Plasmaproteine (außer IgA). Demnach scheint eine wichtige Funktion des α_1 -Achy im Schutz der Lunge vor Chymotrypsin-ähnlichen Enzymen zu bestehen.

α_1 -Achy wurde in vitro mit PMN-Elastase in unterschiedlichen Molverhältnissen inkubiert und dabei rasch inaktiviert. Selbst bei der Verwendung einer sehr geringen Menge PMN-Elastase (0,02 Mol : 1 Mol α_1 -Achy) war die Hemmaktivität des α_1 -Achy gegenüber Chymotrypsin noch zu ca. 80% zerstört (siehe 4.4.1, Abb.15).

Sowohl einfache PAGE als auch SDS-PAGE ließen keinen Abbau des α_1 -Achy erkennen (4.4.2, Abb.16). Mit PMN-Elastase umgesetztes α_1 -Achy wies lediglich bei der SDS-PAGE eine höhere elektrophoretische Mobilität im Vergleich zu reinem α_1 -Achy auf. Möglicher-

weise wird vom α_1 -Achy nur ein kleiner Proteinanteil abgespalten, der sich mit der verwendeten Methode elektrophoretisch nicht erfassen ließ. Das übrige Protein besitzt dann gegenüber reinem α_1 -Achy nur ein geringfügig niedrigeres Molekulargewicht. Andererseits scheint es auch denkbar, daß bei der Behandlung mit PMN-Elastase nur die Molekularstruktur des α_1 -Achy verändert wird, und das Hemmzentrum des α_1 -Achy nicht mehr aktiv ist. Für letztere Vermutung lieferten auch die Elektrophoresen der Proben mit komplexiertem α_1 -Achy (4.4.2, Proben 1-11, Abb. 17a, b) einen Hinweis. Wenn α_1 -Achy mit PMN-Elastase im Molverhältnis 1 : 0,2 umgesetzt wurde, so verlor es die Fähigkeit zur Komplexbildung von α -Chymotrypsin bzw. Cathepsin G (= Chymotrypsin-ähnliche Leukocytenproteinase). Bei vorheriger Hemmung der PMN-Elastase durch Eglin b ließen sich die Komplexe zwischen α_1 -Achy und α -Chymotrypsin bzw. Cathepsin G wieder eindeutig sowohl bei normaler als auch bei SDS-PAGE nachweisen. Die Polyacrylamidgelelektrophoresen zeigen demnach ebenso wie die enzymatischen Tests (4.4.1), daß α_1 -Achy bei Umsetzung mit PMN-Elastase im Molverhältnis 1 : 0,2 seine Hemmaktivität gegenüber α -Chymotrypsin bzw. Cathepsin G verliert (auch bei Einsatz von geringeren Mengen wurde dies bestätigt). Eine proteolytische Spaltung des α_1 -Achy durch PMN-Elastase konnte jedoch mit den von uns verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden.

Bei der Rocket-Immunelektrophorese (4.4.3, Abb. 18) ergab sich für alle Proben nur ein einzelner Präzipitationspeak. Lediglich die Proben mit α_1 -Achy und nicht gehemmter PMN-Elastase wiesen regelmäßig höhere Peaks gegenüber reinem α_1 -Achy auf. Es ließe sich denken, daß bei der Reaktion mit PMN-Elastase das α_1 -Achy-Molekül so verändert wurde, daß vorher nicht aktive Antigen determinanten des α_1 -Achy für die Antikörper zugänglich werden.

Die 2-dimensionale Immunelektrophorese brachte keinerlei Hinweise auf eine Reaktion des α_1 -Achy mit PMN-Elastase. Erstaunlicherweise ließen sich bei der 2-dimensionalen Immunelektrophorese auch die Komplexe zwischen α_1 -Achy und α -Chymotrypsin bzw. Cathepsin G nicht darstellen. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Aasen, A.O., Ohlsson, K., Larsbraaten, M. und Amundsen, E. (1978): Changes in plasminogen levels, plasmin activity and activity of antiplasmin during endotoxin shock in dogs. Eur. Surg.Res.10, 63-72
- 2 Aasen, A.O., Gallimore, M.J., Ohlsson, K. und Amundsen, E. (1978): Alterations of plasmin activity, plasminogen levels and activity of antiplasmins during endotoxin shock in dogs. Haemostasis 7, 164-169
- 3 Andersson, L.-O., Engman, L. und Henningsson, E. (1977): Crossed immunoelectrophoresis as applied to studies on complex formation. The binding of heparin to antithrombin III and the antithrombin III-thrombin complex. J.Immunol.Meth.14, 271-281
- 4 Aoki, N., Saito, H., Kamiya, T., Koie, K., Sakata, Y. und Kobakura, M. (1979): Congenital deficiency of α_2 -plasmin inhibitor with severe hemorrhagic tendency. J.Clin.Invest.63, 877-884
- 5 Appel, W. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U. Hrsg.), 3.Ed., Vol.1, S. 1081-1085, Verlag Chemie, Weinheim, Bergstr.
- 6 Barrowcliffe, T.W. (1979): Studies of heparin binding to antithrombin III by crossed immunoelectrophoresis. Thrombos.Haemostas.42, 1434-1445
- 7 Baugh, R.J. und Travis, J. (1976): Human leukocyte granule elastase: rapid isolation and characterization. Biochem.15, 836-841
- 8 Baumstark, J.S., Ting Lee, C., Luby, R.J. (1977): Rapid inactivation of α_1 -protease inhibitor by elastase. Biochem.Biophys. Acta 482, 400-411
- 9 Bennett, B. (1982): Plasmin- α_2 -antiplasmin complex as an indicator of in vivo fibrinolysis. Brit.J.Haematol.50, 537-541
- 10 Bieth, J.G. (1980): Natural and synthetic inhibitors of pancreatic and leucocyte elastases. Front.Matrix Biol.8, 216-227
- 11 Blauhut, B., Necek, S., Kramar, H., Vinazzer, H. und Bergmann, H. (1980): Activity of antithrombin III and effect of heparin on coagulation in shock. Thromb.Res.19, 775-782

- 12 Brogan, T.D., Ryley, H.C., Lynne, A., Hilary, H. (1971): Relation between sputum sol phase composition and diagnosis in chronic chest disease. *Thorax* 26, 418
- 13 Burnett, D. und Bradwell, A.R. (1980): The origin of plasma proteins in human amniotic fluid: the significance of α_1 -antichymotrypsin complexes. *Biol.Neonate* 37, 302-307
- 14 Burrowes, C.E. und Movat, H.Z. (1977): Isolation of antithrombin III from human plasma: its separation from α_1 -antitrypsin. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 74, 140-149
- 15 Collen, D. (1976): Identification and some properties of a new fast-reacting plasmin inhibitor in human plasma. *Eur.J.Biochem.* 69, 209-216
- 16 Collen, D. und Wiman, B. (1978): Fast-acting plasmin inhibitor in human plasma. *Blood* 51, 563-569
- 17 Collen, D. und Wiman, B. (1979) in: Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis, Vol.4, 11-19: The fast-acting plasmin inhibitor of human plasma - the prix servier lecture
- 18 Dittmer, H. (1985): Der polytraumatisierte Patient - eine Analyse klinischer und pathobiochemischer Parameter. Habilitationsschrift, LMU München
- 19 Duswald, K.H. (1983): Zur Pathobiochemie der Leukozytenelastase und ausgewählter Plasmaproteine bei Sepsis nach abdominal chirurgischen Eingriffen. G.G-i-t-Verlag, Ernst Giebel, Darmstadt
- 20 Egbring, R., Havemann, K., Schmidt, W. und Fuchs, G. (1976): Direkte Proteolyse von Gerinnungsfaktoren durch Granulozytenenzyme als möglicher Mechanismus von Gerinnungsstörungen bei akuter Leukämie. In: Erkrankungen der Myelopoese (Stecher, A., Höcker, P., Hrsg.), Urban und Schwarzenberg, S. 509-551
- 21 Egbring, R., Schmidt, W., Fuchs, G. und Havemann, K. (1977): Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. *Blood* 49, 219-231
- 22 Egbring, R. und Havemann, K. (1978): Possible role of polymorphonuclear granulocyte proteases in blood coagulation. In: Neutral proteases of human polymorphonuclear leucocytes (Havemann, K., Janoff, A., Hrsg.), Urban und Schwarzenberg
- 23 Estell, D.A. und Laskowski, M. Jr. (1980): Dermasterias imbricata trypsin I: An enzyme which rapidly hydrolyzes the reactive site peptide bonds of protein trypsin inhibitors. *Biochem.* 19, 124
- 24 Feinman, R.D. und Li, E.H.H. (1977): Interaction of heparin with thrombin and antithrombin III. *Fed.Proc.* 36, 51-55

- 25 Fish, W.W. und Björk, I. (1979): Release of a two-chain form of antithrombin from the antithrombin-thrombin complex. *Eur.J. Biochem.*101, 31-38
- 26 Fish, W.W., Orre, K. und Björk, I. (1979): The production of an inactive form of antithrombin through limited proteolysis by thrombin. *FEBS Lett.*98, 103-106
- 27 Fish, W.W., Orre, K. und Björk, I. (1979): Routes of thrombin action in the production of proteolytically modified secondary forms of antithrombin-thrombin complex. *Eur.J.Biochem.*101, 39-44
- 28 Fritz, H. (1982) in: Protein degradation in health and disease. *Ciba Found.Symp.*75 (New Series), S. 351-379, Excerpta Med., Amsterdam
- 29 Fryksmark, U., Ohlsson, K., Rosengren, M. und Tegner, H. (1983): Studies on the interaction between leukocyte elastase, anti-leukoproteinase and the plasma proteinase inhibitors α_1 -proteinase inhibitor and α_2 -macroglobulin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.*364, 793-800
- 30 Görg, A., Postel, W. und Westermeier, R. (1978): Ultrathin layer and isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane. *Anal.Biochem.*89, 60-70
- 31 Heimbürger, N. und Haupt, H. (1965): Charakterisierung von α_1 X-Glykoprotein als Chymotrypsin-Inhibitor des Humanplasmas. *Clin. Chim.Acta* 12, 116-118
- 32 Henson, P.M. (1971): The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. *J.Immunol.*107, 1535-1546
- 33 Highsmith, R.F. und Rosenberg, R.D. (1974): The inhibition of human plasmin by human antithrombin-heparin cofactor. *J.Biol. Chem.*249, 4335-4338
- 34 Janoff, A. und Scherer, J. (1968): Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J.Exp.Med.*128, 1137-1151
- 35 Jochum, M., Witte, J., Schiessler, H., Selbmann, H.K., Ruckdeschl, G. und Fritz, H. (1981): Clotting and other plasma factors in experimental endotoxemia: inhibition of degradation by exogenous proteinase inhibitors. *Eur.Surg.Res.*13, 152-168

- 36 Jochum, M., Fritz, H., Duswald, K.-H. und Hiller, E. (1983): Plasma levels of human granulocytic elastase- α_1 -proteinase inhibitor complex (E- α_1 PI) in patients with septicemia and acute leukemia. In: Selected topics in clinical enzymology (Goldberg, G., Wertner, M., Hrsg.) S. 85-100, Walter de Gruyter & Co, Berlin, New York
- 37 Kaplan, P.D., Kunn, C. und Pierce, J.A. (1973): The induction of emphysema with elastase. I. The evolution of the lesion and the influence of serum. J.Lab.Clin.Med.82, 349-356
- 38 Kosaka, S. und Tazawa, M. (1976): α_1 -antichymotrypsin in rheumatoid arthritis. J.Exp.Med.119, 369-375
- 39 Kurachi, K., Schmer, G., Hermodson, M.A., Teller, D.C. und Davie, E.W. (1976): Characterization of human, bovine, and horse antithrombin III. Biochem.15, 368-372
- 40 Laine, A., Davril, M. und Hayem, A. (1982): Interaction between human serum α_1 -antichymotrypsin and human leukocyte cathepsin G - complex formation and production of a modified inhibitor. Biochem.Biophys.Res.Commun.105, 186-193
- 41 Lander, S. (1979): Untersuchungen zur Pathobiochemie von Granulocytenproteasen. Chem. Diplomarbeit an der LMU München
- 42 Li, E.H.H., Fenton, J.W. und Feinman, R.D. (1976): The role of heparin in the thrombin-antithrombin III reaction. Arch.Biochem.Biophys.175, 153-159
- 43 Lindsay, A.M., Plow, E.F., Donnelly, K.J., Hougie, C. und Griffin, J.H. (1982): A bleeding disorder due to deficiency of α_2 -antiplasmin. Blood 59, 1246-1251
- 44 Mahoney, W.C., Kurachi, K. und Hermodson, M.A. (1980): Formation and dissociation of the covalent complexes between trypsin and two homologous inhibitors, α_1 -antitrypsin and antithrombin III. Eur.J.Biochem.105, 545-552
- 45 Moroi, M. und Aoki, N. (1976): Isolation and characterization of α_2 -plasmin inhibitor from human plasma. J.Biol.Chem.251, 5956-5965
- 46 Moroi, M. und Aoki, N. (1977): On the interaction of α_2 -plasmin-inhibitor and proteases. Evidence for the formation of a covalent crosslinkage and non-covalent weak bondings between the inhibitor and proteases. Biochim.Biophys.Acta 482, 412-420

- 47 Moroi, M. und Aoki, N. (1977): Inhibition of proteases in coagulation, kinin-forming and complement systems by α_2 -plasmin inhibitor. *J.Biochem.*82, 969-972
- 48 Müllertz, S. und Clemmensen, I. (1976): The primary inhibitor of plasmin in human plasma. *Biochem.J.*159, 545-553
- 49 Nilsson, T. und Wiman, B. (1982): On the structure of the stable complex between plasmin and α_2 -antiplasmin. *FEBS.Lett.*142, 111-114
- 50 Ødegaard, O.R., Abildgaard, U., Lie, M. und Miller-Andersson, M. (1977): Inactivation of bovine and human thrombin and factor Xa by antithrombin III studied with amidolytic methods. *Thromb. Res.*11, 205-216
- 51 Ohlsson, K. (1971): Neutral leucocyte proteases and elastase inhibited by plasma α_1 -antitrypsin. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*28, 251-253
- 52 Ohlsson, K. und Olsson, J. (1974): Neutral proteases of human granulocytes III. Interaction between human granulocyte elastase and plasma protease inhibitors. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*34, 349-355
- 53 Ohlsson, K. (1975): Granulocyte collagenase and elastase and their interactions with α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin. In: *Proteases and biological control*, Cold Spring Harbor Lab., S.591-602
- 54 Ohlsson, K. und Akeson, U. (1976): α_1 -antichymotrypsin interaction with cationic proteins from granulocytes. *Clin.Chim. Acta* 73, 285-291
- 55 Ohlsson, K., Olsson, I., Delshammar, M. und Schiessler, H. (1976): Elastase from human and canine granulocytes, I Some proteolytic and esterolytic properties. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.*357, 1245-1250
- 56 Ohlsson, K. und Collen, D. (1977): Comparison of the reactions of neutral granulocyte proteases with the major plasma protease inhibitors and with antiplasmin. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*37, 345-350
- 57 Ohlsson, K. und Olsson, A.-S. (1978): Immunoreactive granulocytic elastase in human serum. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*359, 1531-1539

- 58 Owen, W.G. (1977): Effect of heparin on the extent of inhibition of thrombin by heparin cofactor. *Biochim.Biophys.Acta* 494, 182-190
- 59 Rosenberg, R.D. und Damus, P.S. (1973): The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J.Biol.Chem.* 248, 6490-6505
- 60 Ryley, H.C., Brogan, T.D. (1972): Quantitative immunoelectrophoretic analysis of the plasma proteins in the sol phase of sputum from patients with chronic bronchitis. *J.Clin.Pathol.* 26, 852
- 61 Schiessler, H., Ohlsson, K., Olsson, I., Arnhold, M., Birk, Y. und Fritz, H. (1977): Elastases from human and canine granulocytes, II Interaction with protease inhibitors of animal, plant, and microbial origin. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 358, 53-58
- 62 Schipper, H.G., Roos, J., v.d. Meulen, F. und ten Cate, J.W. (1981): Antithrombin III deficiency in surgical intensive care patients. *Thromb.Res.* 21, 73-80
- 63 Schmidt, W., Egbring, R. und Havemann, K. (1975): Effect of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases from human granulocytes on isolated clotting factors. *Thromb.Res.* 6, 315-326
- 64 Schramm, W. (1981): Antithrombin III-Mangel: Klinische Symptome und Möglichkeiten der Therapie. *Die gelben Hefte* 21, 1-6
- 65 Seegers, W.H. (1978): Antithrombin III. Theory and clinical applications. *Amer.J.Clin.Pathol.* 69, 367-374
- 66 Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Müller, H.-P. und Fritz, H. (1977): Isolation and characterization of a low molecular weight inhibitor (of chymotrypsin and human granulocytic elastase and cathepsin G) from leeches. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 358, 1105-1117
- 67 Seemüller, U., Eulitz, M. (1982): Inhibitors of human neutral granulocytic proteinase from the leech: Biochemical characterization and pathobiochemical aspects. *Chemistry of peptides and proteins* 1
- 68 Travis, J., Garner, D. und Bowen, J. (1978): Human α_1 -antichymotrypsin: purification and properties. *Biochem.* 17, 5647-5651
- 69 Travis, J., Bowen, J. und Baugh, R. (1978): Human α_1 -antichymotrypsin: interaction with chymotrypsin-like proteinases. *Biochem.* 17, 5651-5656

- 70 Walker, F.J. und Esmon, C.T. (1979): The effect of prothrombin fragment 2 on the inhibition of thrombin by antithrombin III. *J.Biol.Chem.*254, 5618-5622
- 71 Weissman, G., Zurier, R.B., Spieler, P.J. und Goldstein, I.M. (1971): Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes exposed to immune complexes and other particles. *J.Exp.Med.*134, 149-165
- 72 Wiman, B. und Collen, D. (1977): Purification and characterization of human antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor in plasma. *Eur.J.Biochem.*78, 19-26
- 73 Wiman, B. (1981): Human α_2 -antiplasmin. *Meth.Enzymol.*80, 395-409
- 74 Witte, J., Jochum, M., Scherer, R., Schramm, W., Hochstrasser, K. und Fritz, H. (1982): Disturbance of selected plasma proteins in hyperdynamic septic shock. *Int.Care Med.*8, 215-222

LEBENS LAUF

Am 30. September 1954 wurde ich, Stefan Lander, als Sohn des Internisten Dr.med. Eberhard Lander und seiner Ehefrau Dr.med. Rosemarie Lander, geb. Meisinger, in München geboren.

Ich besuchte 4 Jahre lang die Leipziger Volksschule in München und trat anschließend ans Wittelsbacher Gymnasium über. 1973 erhielt ich das Zeugnis der Reife.

Im Wintersemester 1973/74 begann ich das Studium der Chemie (Diplom an der LMU). Am 20.12.1979 bestand ich die Prüfung zum Diplom-Chemiker mit Erfolg. Seit dem Sommersemester 1978 hatte ich zwischenzeitlich das Studium der Humanmedizin an der LMU begonnen (bis 1980 Doppelstudium) und erhielt am 24.11.1983 die Approbation als Arzt.

Vom 1.1. - 1.3.84 arbeitete ich als wissenschaftlicher Assistent im Deutschen Herzzentrum München bei Prof.Dr.med. Struck. Seit dem 1.3.1984 bin ich als Assistenzarzt in der Maria-Theresia-Klinik München angestellt. Mein Wunsch ist es, Chirurg zu werden.

